

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/EP05/001865

International filing date: 23 February 2005 (23.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE

Number: 10 2004 009 458.6

Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 11 April 2005 (11.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 10 2004 009 458.6

Anmeldetag: 27. Februar 2004

Anmelder/Inhaber: BASF Plant Science GmbH, 67056 Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung ungesättigten  $\omega$ -3-Fett-  
säuren in transgenen Organismen

IPC: C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 23. Dezember 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Kahle

Verfahren zur Herstellung ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren in transgenen Organismen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten  $\omega$ -3 Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, besonders von  $\omega$ -3 Fettsäuren mit mehr als drei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\omega$ -3-Doppelbindungen aufgrund der Expression einer  $\omega$ -3-Desaturase aus Pilzen der Familie Pythiaceae wie der Gattung Phytophthora beispielsweise der Gattung und Art Phytophthora infestans.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, mindestens einen Vektor enthaltend die Nukleinsäuresequenz und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren.

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

Fettsäuren und Triacylglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren oder um Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet.

Mehrfach ungesättigte langkettige  $\omega$ -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (= EPA, C<sub>20</sub>:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>) oder Docosahexaensäure (= DHA, C<sub>22</sub>:6<sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>) sind wichtige Komponenten der menschlichen Ernährung aufgrund ihrer verschiedenen Rollen in der Gesundheit, die Aspekte wie die Entwicklung des kindlichen Gehirns, der Funktionalität des Auges, der Synthese von Hormonen und anderer Signalstoffe, sowie die Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Beschwerden, Krebs und Diabetes umfassen (Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LA und Yeo YK Pharmacol Res 40:211-225, 1999). Es besteht aus diesem Grund ein Bedarf an der Produktion mehrfach ungesättiger langkettiger Fettsäuren.

Aufgrund der heute üblichen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist ein Zusatz von mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, die bevorzugt in Fischölen vorkommen, zur Nahrung besonders wichtig. So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA oder EPA Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Der ungesättigten Fettsäure DHA wird dabei ein positiver Effekt auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gehirnfunktionen zugeschrieben.

Im folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFAs, LCPUFA oder LCPUFAs bezeichnet (poly unsaturated fatty acids, PUFA, mehrfach ungesättigte Fettsäuren; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

- 5      Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder Schizochytrium oder aus Ölproduzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Algen wie Cryptothecodium oder Phaeodactylum und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = Triglycerole) anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie z.B. Fischen gewonnen werden. Die freien  
10     Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt. Sehr langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA, Arachidonsäure (= ARA, C<sub>20</sub>:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>), Di-homo-γ-linolensäure (C<sub>20</sub>:3<sup>Δ8,11,14</sup>) oder Docosapentaensäure (DPA, C<sub>22</sub>:5<sup>Δ7,10,13,16,19</sup>) werden in Pflanzen z.B. Ölfruchtpflanzen wie Raps, Soja, Sonnenblume, Färberdistel nicht synthetisiert. Übliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische wie  
15     Hering, Lachs, Sardine, Goldbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Thunfisch oder Algen.

Je nach Anwendungszweck werden Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. So werden z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fett-  
säuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach unge-  
sättigten ω-3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt auf den Cholesterinspiegel

- 20     im Blut und damit auf die Möglichkeit der Prävention einer Herzerkrankung zuge-  
schrieben. Durch Zugabe dieser ω-3-Fettsäuren zu Nahrung kann das Risiko einer  
Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert  
werden. Auch entzündliche speziell chronisch entzündliche Prozesse im Rahmen  
25     immunologischer Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis lassen sich durch ω-3-  
Fettsäuren positiv beeinflussen. Sie werden deshalb Lebensmitteln speziell diätischen  
Lebensmitteln zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung. ω-6-Fettsäuren  
wie Arachidonsäure haben bei diesen rheumatischen Erkrankungen aufgrund unserer  
üblichen Nahrungsmittelzusammensetzung eher einen negativen Effekt auf diese  
30     Krankheiten.

ω-3- und ω-6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, den sogenannten Eicosanoiden wie den Prostaglandinen, die sich von der Di-homo-γ-linolensäure, der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten, den Thromoxanen und Leukotrienen, die sich von der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten.

- 35     Eicosanoide (sog. PG<sub>2</sub>-Serie), die aus ω-6-Fettsäuren gebildet werden fördern in der Regel Entzündungsreaktionen, während Eicosanoide (sog. PG<sub>3</sub>-Serie) aus ω-3-Fettsäuren geringe oder keine entzündungsfördernde Wirkung haben. Deshalb spricht man Lebensmittel mit einem hohen ω-3-Fettsäureanteil einen positiven Effekt auf die menschliche Gesundheit zu.

- 40     Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für

die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ-9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ-15-Desaturase, in WO 94/11516 wird eine Δ-12-Desaturase beansprucht. Weitere

- 5 Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144–20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200–203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649–659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme  
10 als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und zu charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141–12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777–792). In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organismus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird. Δ-6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US 5614393,  
15 WO 96/21022, WO 00/21557 und WO 99/27111 beschrieben und auch die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen beschrieben wie in WO 98/46763 WO 98/46764, WO 9846765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desaturasen wie in WO 99/64616 oder WO 98/46776 und Bildung polyungesättigter Fettsäuren beschrieben und beansprucht. Bzgl. der Effektivität der Expression von Desaturasen und ihren Einfluss auf die Bildung polyungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, dass durch Expression einer einzelnen Desaturase wie bisher beschrieben lediglich geringe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z.B. γ-Linolensäure und Stearidonsäure erreicht wurden. Weiterhin werden in der Regel Gemische aus  
20 ω-3- und ω-6-Fettsäuren erhalten.

Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFA sind Mikroorganismen wie Mikroalgen wie Phaeodactylum tricornutum, Porphyridium-Arten, Thraustochytrien-Arten, Schizophytrien-Arten oder Cryptocodonium-Arten, Ciliaten, wie Styloynchia oder Colpidium, Pilze, wie Mortierella, Entomophthora oder Mucor und/oder Moosen wie Physcomitrella, Ceratodon und Marchantia (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) Botanica Marina 41: 553-558; K. Totani & K. Oba (1987) Lipids 22: 1060-1062; M. Akimoto et al. (1998) Appl. Biochemistry and Biotechnology 73: 269-278). Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFA, produzieren. Die Mutation und Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls wie den mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Deshalb werden, wenn immer möglich wie oben beschrieben gentechnologische Verfahren bevorzugt. Mit Hilfe der vorgenannten Mikroorganismen lassen sich jedoch nur begrenzte Mengen der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DPA, EPA oder ARA herstellen. Wobei diese in der Regel je nach verwendetem Mikroorganismus als Fettsäuregemische aus beispielsweise EPA, DPA und ARA anfallen.  
30  
35  
40

Für die Synthese der polyungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure werden verschiedene Synthesewege diskutiert (Fig. 1). So erfolgt die Produktion von EPA oder DHA in zahlreichen marinen Bakterien wie Vibrio sp. oder Shewanella sp. nach dem Polyketid-Weg (Yu, R. et al. Lipids 35:1061-

5 1064, 2000; Takeyama, H. et al. Microbiology 143:2725-2731, 1197)).

Ein alternative Strategie verläuft über die wechselnde Aktivität von Desaturasen und Elongasen (Zank, T.K. et al. Plant Journal 31:255-268, 2002; Sakuradani, E. et al. Gene 238:445-453, 1999). Eine Modifikation des beschriebenen Weges über  $\Delta 6$ -Desaturase,  $\Delta 6$ -Elongase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 5$ -Elongase,  $\Delta 4$ -Desaturase ist der Sprecher-Syntheseweg (Sprecher 2000, Biochim. Biophys. Acta 1486:219-231) in Säugetieren. Anstelle der  $\Delta 4$ -Desaturierung erfolgt hier ein weiterer Elongationsschritt auf C<sub>24</sub>, eine weitere  $\Delta 6$ -Desaturierung und abschließend eine  $\beta$ -Oxidation auf die C<sub>22</sub>-Kettenlänge. Für die Herstellung in Pflanzen und Mikroorganismen ist der sogenannte Sprecher-Syntheseweg (siehe Figur 1) allerdings nicht geeignet, da die Regulationsmechanismen nicht bekannt sind.

Die polyungesättigten Fettsäuren können entsprechend ihrem Desaturierungsmuster in zwei große Klassen, in  $\omega$ -6- oder  $\omega$ -3-Fettsäuren eingeteilt werden, die metabolisch und funktionell unterschiedlich Aktivitäten haben (Fig. 1).

Als Ausgangsprodukt für den  $\omega$ -6-Stoffwechselweg fungiert die Fettsäure Linolsäure (18:2<sup>Δ9,12</sup>), während der  $\omega$ -3-Weg über Linolensäure (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) abläuft. Linolensäure wird dabei durch Aktivität einer  $\omega$ -3-Desaturase gebildet (Tocher et al. 1998, Prog. Lipid Res. 37, 73-117 ; Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113).

Säugetiere und damit auch der Mensch verfügen über keine entsprechende Desaturaseaktivität ( $\Delta$ -12- und  $\omega$ -3-Desaturase) und müssen diese Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Über die Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen werden dann aus diesen Vorstufen die physiologisch wichtigen polyungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA, 20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>), eine  $\omega$ -6-Fettsäure und die beiden  $\omega$ -3-Fettsäuren Eicosapentaen- (= EPA, 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6<sup>Δ4,7,10,13,17,19</sup>) synthetisiert. Die Applikation von  $\omega$ -3-Fettsäuren zeigt dabei die wie oben beschrieben therapeutische Wirkung bei der Behandlung von Herz-Kreislaufkrankheiten (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100-108), Entzündungen (Calder 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345-358) und Arthridis (Cleland und James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305-2307).

Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist es deshalb wichtig bei der Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren eine Verschiebung zwischen dem  $\omega$ -6-Syntheseweg und dem  $\omega$ -3-Syntheseweg (siehe Figur 1) zu erreichen, so dass mehr  $\omega$ -3-Fettsäuren hergestellt werden. In der Literatur wurden die enzymatischen Aktivitäten verschiedener  $\omega$ -3-Desaturasen beschrieben, die C<sub>18:2</sub>-, C<sub>22:4</sub>- oder C<sub>22:5</sub>-Fettsäuren desaturieren (siehe Figur 1). Keine der biochemisch beschriebenen Desaturasen setzt jedoch ein breites Substratspektrum des  $\omega$ -6-Synthesewegs zu den entsprechenden Fettsäuren des  $\omega$ -3-Syntheseweg um.

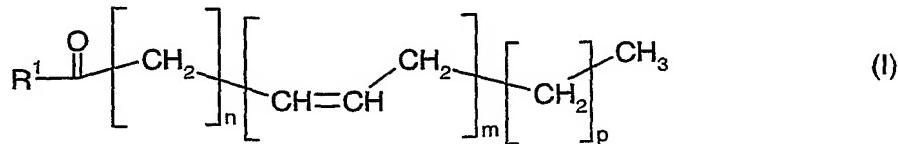
Es besteht daher weiterhin ein großer Bedarf an einer  $\omega$ -3-Desaturase, die zur Herstellung von  $\omega$ -3-polyungesättigte Fettsäuren geeignet ist. Alle bekannten pflanzlichen und cyanobakteriellen  $\omega$ -3-Desaturasen desaturieren C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit Linolsäure als Substrat, können aber keine C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren desaturieren.

- 5 Von dem Pilz *Saprolegnia dicilina* ist eine  $\omega$ -3-Desaturase bekannt (Pereira et al. 2003, Biochem. J. 2003 Dez, Manuskript BJ20031319), die C<sub>20</sub>-mehrfach ungesättigte Fettsäuren desaturieren kann. Von Nachteil ist jedoch, dass diese  $\omega$ -3-Desaturase keine C<sub>18</sub>- oder C<sub>22</sub>-PUFAs, wie den wichtigen Fettsäuren C<sub>18:2</sub>-, C<sub>22:4</sub>- oder C<sub>22:5</sub>-Fettsäuren des  $\omega$ -6-Syntheseweg desaturieren kann. Ein weiterer Nachteil dieses Enzyms ist,
- 10 dass es keine Fettsäuren desaturieren kann, die an Phospholipide gebunden sind. Es werden nur die CoA-Fettsäureester umgesetzt.

Um eine Anreicherung der Nahrung und des Futters mit diesen mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren speziell in eukaryontischen Systemen.

Es bestand daher die Aufgabe weitere Gene bzw. Enzyme, die für die Synthese von LCPUFAs geeignet sind und eine Verschiebung vom  $\omega$ -6-Syntheseweg zum  $\omega$ -3-Syntheseweg hin ermöglichen, speziell Gene, die eine  $\omega$ -3-Deaturaseaktivität aufweisen, für die Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zur Verfügung zu stellen.

- 20 Weiterhin bestand die Aufgabe ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren in einem Organismus vorteilhaft in einem eukaryontischen Organismus bevorzugt in einer Pflanze oder einem Mikroorganismus zu entwickeln. Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



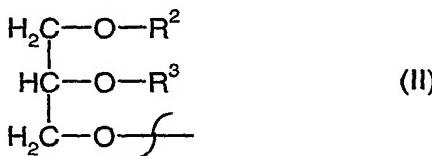
25

in transgenen Organismen mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.-% dieser Verbindungen bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- 30 a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität codiert, und
- b) Anzucht des Organismus unter Bedingungen, die die Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel I ermöglicht, und

wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

$R^1$  = Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II

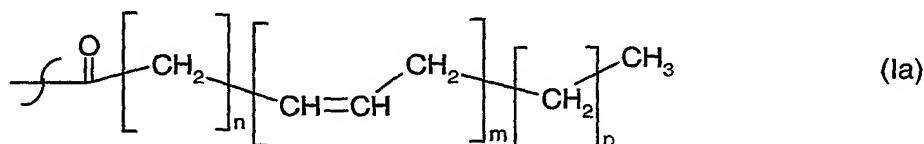


5

$R^2 =$  Wasserstoff-, Lysophosphatidylcholin-, Lysophosphatidylethanolamin-, Lysophosphatidylglycerol-, Lysophosphatidylglycerol-, Lysophosphatidylserin-, Lysophosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-,

10

$R^3$  = Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-, oder R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:

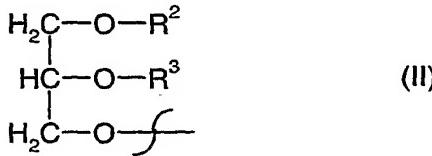


$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $9$ ,  $m = 2, 3, 4, 5$  oder  $6$ ,  $p = 0$  oder  $3$ .

$R^1$  bedeutet in der allgemeinen Formel I Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-

15

Phosphatidylcholin-, Lysophosphatidylethanolamin-, Lysophosphatidylglycerol-,  
Lysophosphatidylglycerol-, Lysophosphatidylserin-, Lysophosphatidylinositol-,  
Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



Die oben genannten Reste von R<sup>1</sup> sind immer in Form ihrer Thioester an die Verbindungen der allgemeinen Formel I gebunden.

R<sup>2</sup> bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-,

Als Alkylreste seien substituiert oder unsubstituiert, gesättigt oder ungesättigte C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentylcarbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-, n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-,

- 5 n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Gesättigte oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, 10 n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>11</sub>-Alkylcarbonyl-, 15 C<sub>12</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>13</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>14</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen, besonders bevorzugt zwei, drei oder vier Doppelbindungen. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fett- 20 säuren ab.

R<sup>3</sup> bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-.

Als Alkylreste seien substituiert oder unsubstituiert, gesättigt oder ungesättigte C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentylcarbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-, n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die ein oder mehrere 30 Doppelbindungen enthalten. Gesättigte oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>11</sub>-Alkylcarbonyl-, 35 C<sub>12</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>13</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>14</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen, besonders bevorzugt zwei, drei oder vier Doppelbindungen. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fett- 40 säuren ab.

R<sup>3</sup> bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-.

Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C<sub>16</sub>–C<sub>22</sub>–Alkylcarbonylreste wie C<sub>16</sub>–Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>–Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>–Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>–Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppel-

5 bindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen, besonders bevorzugt zwei, drei oder vier Doppelbindungen. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fett-

säuren ab.

10 Die oben genannten Reste von R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> können mit Hydroxyl- und/oder Epoxygruppen substituierte sein und/oder können Dreifachbindungen enthalten.

Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßem Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens zwei vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Besonders vorteilhaft enthalten die Fettsäuren zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen. Im Verfahren hergestellte Fettsäuren haben vorteilhaft 18-, 20- oder 22-C-Atome in der Fettsäurekette, bevorzugt enthalten die Fettsäuren 20 oder 22 Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette. Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren wenig oder gar nicht umgesetzt.

15 Unter wenig ist zu verstehen, das im Vergleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 % der Aktivität, vorteilhaft weniger als 3 %, besonders vorteilhaft mit weniger als 2 % umgesetzt werden. Diese hergestellten Fettsäuren können als einziges Produkt im Verfahren hergestellt werden oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

20 Bei den im erfindungsgemäßem Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit ω-3-Desaturaseaktivität codieren.

25 Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßem Verfahren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit ω-3-Desaturaseaktivität codieren, verwendet, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 30 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von den in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2 codieren und eine ω-3-Desaturaseaktivität aufweisen.

35 Vorteilhaft bedeuten die Substituenten R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> in den allgemeinen Formeln I und II unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>16</sub>–C<sub>22</sub>–Alkylcarbonyl-, be-

sonders vorteilhaft bedeuten sie unabhängig voneinander ungesättigtes C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonyl- mit mindestens zwei Doppelbindungen.

Die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhaft in Membranlipiden und/oder Triacylglyceriden gebunden, können aber auch als frei Fettsäuren oder aber gebunden in Form anderer Fettsäureester in den Organismen vorkommen. Dabei können sie als "Reinprodukte" oder aber vorteilhaft in Form von Mischungen verschiedener Fettsäuren oder Mischungen unterschiedlicher Glyceride vorliegen. Die in den Triacylglyceriden gebundenen verschiedenen Fettsäuren lassen sich dabei von kurzkettigen Fettsäuren mit 4 bis 6 C-Atomen, mittelkettigen Fettsäuren mit 8 bis 12 C-Atomen oder langkettigen Fettsäuren mit 14 bis 24 C-Atomen ableiten,

10 bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren, besonders bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren LCPUFAs von C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester, vorteilhaft mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester, besonders vorteilhaft von mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt und führen vorteilhaft zur Synthese von Linolensäure (=LA, C18:2<sup>Δ9,12,15</sup>), γ-Linolensäure (= GLA, C18:3<sup>Δ6,9,12</sup>), Stearidonsäure (= SDA, C18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>), Dihomo-γ-Linolensäure (= DGLA, 20 20:3<sup>Δ8,11,14</sup>), ω-3-Eicosatetraensäure (= ETA, C20:4<sup>Δ8,11,14,17</sup>), Arachidonsäure (ARA, C20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>), ω-6-Docosapentaensäure (C22:5<sup>Δ4,7,10,13,16</sup>), ω-3-Docosapentaensäure (C22:5<sup>Δ7,10,13,16,19</sup>), Docosahexaensäure (= DHA, C22:6<sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>) oder deren Mischungen, bevorzugt ARA, EPA und/oder DHA.

25 Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen können aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide wie Glycosphingolipide, Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerol, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester wie die AcetylCoenzymA-Ester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten, isoliert werden, vorteilhaft werden sie in der Form ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form des Phosphatidylcholin isoliert, besonders bevorzugt in der Form der Triacylglyceride. Neben diesen Estern sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch als freie Fettsäuren oder gebunden in anderen Verbindungen in den Organismen vorteilhaft den Pflanzen enthalten. In der Regel liegen die verschiedenen vorgenannten Verbindungen (Fettsäureester und frei Fettsäuren) in den Organismen in einer ungefähren Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% Triglyceride, 2 bis 5 Gew.-% Diglyceride, 5 bis 10 Gew.-% Monoglyceride, 1 bis 5 Gew.-% freie Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% Phospho-

lipide vor, wobei sich die Summe der verschiedenen Verbindungen zu 100 Gew.-% ergänzt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die hergestellten LCPUFAs mit einem Gehalt von mindestens 3 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 5 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 8 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 15 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fett- säuren in der transgenen Organismen vorteilhaft in einer transgenen Pflanze her- gestellt. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in gebundener Form hergestellt. Mit Hilfe der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren lassen sich diese ungesättigten Fettsäuren an sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhaft her- gestellten Triglyceride bringen. Im PUFA-Herstellverfahren werden die erfindungs- gemäßen  $\omega$ -3-Desaturasesequenzen vorteilhaft in Kombination mit weiteren Genen der PUFA-Synthese wie dem  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -9-Elongasegen verwendet.

15 Dadurch können im erfindungsgemäßen Verfahren ausgehend von den Verbindungen Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) über mehrere Reaktionsschritte die End- produkte des Verfahrens beispielsweise Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA),  $\omega$ -6-Docosapentaensäure oder DHA hergestellt werden. Diese fallen in der Regel nicht als absolute Reinprodukte an, es sind i.d.R. auch geringe Spuren der Vor- stufen im Endprodukt enthalten. Sind in dem Ausgangsorganismus bzw. in der Aus- gangspflanze beispielsweise sowohl Linolsäure als auch Linolensäure vorhanden, so liegen die Endprodukte wie ARA, EPA oder DHA als Mischungen vor. Die Vorstufen sollten vorteilhaft nicht mehr als 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht als 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-% bezogen auf die Menge des jeweilige Endprodukts betragen. Vorteilhaft werden in einer transgenen Pflanze als Endprodukte nur ARA, EPA oder nur DHA im erfindungsgemäßen Verfahren gebunden oder als freie Säuren hergestellt. Werden die Verbindungen ARA, EPA und DHA gleichzeitig hergestellt, werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindesten 1:1:2 (EPA:ARA:DHA), vorteilhaft von mindestens 1:1:3, bevorzugt von 1:1:4, besonders bevorzugt von 1:1:5 hergestellt.

30 Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, enthalten vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearin- säure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fett- säure sind in den Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische bevorzugt mindestens 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäure- gemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaen- säure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9- Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopenten-dodecansäure),

## 11

Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxy-octadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyininsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-

- 5 Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diynonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure),  
10 Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadien-allensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßigen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren oder keine Buttersäure, kein Cholesterin, keine  
15 Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5<sup>Δ4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

Durch die erfindungsgemäßigen Nukleinsäuresequenzen bzw. im erfindungsgemäßigen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten ω-3-Fettsäuren von mindestens 50 %, vorteilhaft von

- 20 mindestens 80 %, besonders vorteilhaft von mindestens 100 %, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 150 % gegenüber den nicht transgenen Ausgangsorganismus beispielsweise einer Hefe, einer Alge, einem Pilz oder einer Pflanze wie Arabidopsis oder Lein beim Vergleich in der GC-Analyse siehe Beispiele erreicht werden.

Auch chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Fettsäuren oder die Fettsäurezusammensetzungen aus dem Organismus wie den Mikroorganismen oder den Pflanzen oder dem Kulturmedium, in dem oder auf dem die Organismen angezogen wurden, oder aus dem Organismus und dem Kulturmedium in bekannter Weise beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Methoden isoliert. Diese chemisch reinen Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich der Lebensmittelindustrie, der Kosmetikindustrie und besonders der Pharmaindustrie vorteilhaft.

- 30 Als Organismus für die Herstellung im erfindungsgemäßigen Verfahren kommen prinzipiell alle Organismen wie Mikroorganismen, nicht-humane Tiere oder Pflanzen in Frage.

Als Pflanzen kommen prinzipiell alle Pflanzen in Frage, die in der Lage sind Fettsäuren zu synthetisieren wie alle dicotylen oder monokotylen Pflanzen, Algen oder Moose. Vorteilhaft Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien Adelotheciaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae,

## 12

Cryptecodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Prasinophyceae oder Gemüsepflanzen oder Zierpflanzen wie Tagetes in Betracht.

- 5 Beispielhaft seien die folgenden Pflanzen genannt ausgewählt aus der Gruppe: Adelotheciaceae wie die Gattungen Physcomitrella z.B. die Gattung und Arten *Physcomitrella patens*, Anacardiaceae wie die Gattungen Pistacia, Mangifera, Anacardium z.B. die Gattung und Arten *Pistacia vera* [Pistazie], *Mangifer indica* [Mango] oder *Anacardium occidentale* [Cashew], Asteraceae wie die Gattungen Calendula, Carthamus, 10 Centaurea, Cichorium, Cynara, Helianthus, Lactuca, Locusta, Tagetes, Valeriana z.B. die Gattung und Arten *Calendula officinalis* [Garten-Ringelblume], *Carthamus tinctorius* [Färberdistel, safflower], *Centaurea cyanus* [Kornblume], *Cichorium intybus* [Wegwarte], *Cynara scolymus* [Artichoke], *Helianthus annus* [Sonnenblume], *Lactuca sativa*, *Lactuca crispa*, *Lactuca esculenta*, *Lactuca scariola L. ssp. sativa*, *Lactuca scariola L. var. integrata*, *Lactuca scariola L. var. integrifolia*, *Lactuca sativa subsp. romana*, *Locusta communis*, *Valeriana locusta* [Salat], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta* oder *Tagetes tenuifolia* [Studentenblume], Apiaceae wie die Gattung Daucus z.B. die Gattung und Art *Daucus carota* [Karotte], Betulaceae wie die Gattung Corylus z.B. die Gattungen und Arten *Corylus avellana* oder *Corylus colurna* [Haselnuss], Boraginaceae wie die Gattung Borago z.B. die Gattung und Art *Borago officinalis* [Borretsch], Brassicaceae wie die Gattungen Brassica, Melanosinapis, Sinapis, Arabadopsis z.B. die Gattungen und Arten *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [Raps], *Sinapis arvensis* *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapoides*, *Melanosisinapis communis* 25 [Senf], *Brassica oleracea* [Futterrübe] oder *Arabidopsis thaliana*, Bromeliaceae wie die Gattungen Anana, Bromelia (Ananas) z.B. die Gattungen und Arten *Anana comosus*, *Ananas ananas* oder *Bromelia comosa* [Ananas], Caricaceae wie die Gattung Carica wie die Gattung und Art *Carica papaya* [Papaya], Cannabaceae wie die Gattung Cannabis wie die Gattung und Art *Cannabis sative* [Hanf], Convolvulaceae wie die 30 Gattungen Ipomea, Convolvulus z.B. die Gattungen und Arten *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* oder *Convolvulus pandurus* [Süßkartoffel, Batate], Chenopodiaceae wie die Gattung Beta wie die Gattungen und Arten *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *Vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris* 35 var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva* oder *Beta vulgaris* var. *esculenta* [Zucker-rübe], Cryptecodiniaceae wie die Gattung Cryptecodinium z.B. die Gattung und Art *Cryptecodinium cohnii*, Cucurbitaceae wie die Gattung Cucubita z.B. die Gattungen und Arten *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* oder *Cucurbita moschata* [Kürbis], Cymbellaceae wie die Gattungen Amphora, Cymbella, Okedenia, 40 Phaeodactylum, Reimeria z.B. die Gattung und Art *Phaeodactylum tricornutum*, Ditrichaceae wie die Gattungen Ditrichaceae, Astomiopsis, Ceratodon, Chrysoblastella, Ditrichum, Distichium, Eccremidium, Lophidion, Philibertiella, Pleuridium, Saelania, Trichodon, Skottsbergia z.B. die Gattungen und Arten *Ceratodon antarcticus*, *Ceratodon columbiae*, *Ceratodon heterophyllus*, *Ceratodon purpurascens*, *Ceratodon pur-*

pureus, *Ceratodon purpureus* ssp. *convolutus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *stenocarpus*, *Ceratodon purpureus* var. *rotundifolius*, *Ceratodon ratodon*, *Ceratodon stenocarpus*, *Chrysoblastella chilensis*, *Ditrichum ambiguum*, *Ditrichum brevisetum*, *Ditrichum crispatisimum*, *Ditrichum difficile*, *Ditrichum falcifolium*, *Ditrichum flexicaule*, *Ditrichum giganteum*, *Ditrichum heteromallum*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum pallidum*, *Ditrichum punctulatum*, *Ditrichum pusillum*, *Ditrichum pusillum* var. *tortile*, *Ditrichum rhynchostegium*, *Ditrichum schimperi*, *Ditrichum tortile*, *Distichium capillaceum*, *Distichium hagenii*, *Distichium inclinatum*, *Distichium macounii*, *Eccremidium floridanum*, *Eccremidium whiteleggei*, *Lophidion strictus*, *Pleuridium acuminatum*, *Pleuridium alternifolium*, *Pleuridium holdridgei*, *Pleuridium mexicanum*, *Pleuridium ravenelii*, *Pleuridium subulatum*, *Saelania glaucescens*, *Trichodon borealis*, *Trichodon cylindricus* oder *Trichodon cylindricus* var. *oblongus*, Elaeagnaceae wie die Gattung *Elaeagnus* z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* [Olive], Ericaceae wie die Gattung *Kalmia* z.B. die Gattungen und Arten  
15 *Kalmia latifolia*, *Kalmia angustifolia*, *Kalmia microphylla*, *Kalmia polifolia*, *Kalmia occidentalis*, *Cistus chamaerhodendros* oder *Kalmia lucida* [Berglorbeer], Euphorbiaceae wie die Gattungen *Manihot*, *Janipha*, *Jatropha*, *Ricinus* z.B. die Gattungen und Arten *Manihot utilissima*, *Janipha manihot*, *Jatropha manihot.*, *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanobasis*, *Manihot esculenta* [*Manihot*] oder *Ricinus*  
20 20 *communis* [*Ricinus*], Fabaceae wie die Gattungen *Pisum*, *Albizia*, *Cathormion*, *Feuillea*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Acacia*, *Mimosa*, *Medicago*, *Glycine*, *Dolichos*, *Phaseolus*, *Soja* z.B. die Gattungen und Arten *Pisum sativum*, *Pisum arvense*, *Pisum humile* [Erbse], *Albizia berteriana*, *Albizia julibrissin*, *Albizia lebbeck*, *Acacia berteriana*, *Acacia littoralis*, *Albizia berteriana*, *Albizzia berteriana*, *Cathormion berteriana*, *Feuillea berteriana*, *Inga fragrans*, *Pithecellobium berterianum*, *Pithecellobium fragrans*, *Pithecellobium berterianum*, *Pseudalbizzia berteriana*, *Acacia julibrissin*, *Acacia nemu*, *Albizia nemu*, *Feuillea julibrissin*, *Mimosa julibrissin*, *Mimosa speciosa*, *Sericanrda julibrissin*, *Acacia lebbeck*, *Acacia macrophylla*, *Albizia lebbek*, *Feuillea lebbeck*, *Mimosa lebbeck*, *Mimosa speciosa* [Seidenbaum], *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Medicago varia*  
25 30 *[Alfalfa]* *Glycine max* *Dolichos soja*, *Glycine gracilis*, *Glycine hispida*, *Phaseolus max*, *Soja hispida* oder *Soja max* [*Sojabohne*], Funariaceae wie die Gattungen *Aphanorrhagma*, *Entosthodon*, *Funaria*, *Physcomitrella*, *Physcomitrium* z.B. die Gattungen und Arten *Aphanorrhagma serratum*, *Entosthodon attenuatus*, *Entosthodon bolanderi*, *Entosthodon bonplandii*, *Entosthodon californicus*, *Entosthodon drummondii*, *Entosthodon jamesonii*, *Entosthodon leibergii*, *Entosthodon neoscoticus*, *Entosthodon rubristus*, *Entosthodon spathulifolius*, *Entosthodon tucsoni*, *Funaria americana*, *Funaria bolanderi*, *Funaria calcarea*, *Funaria californica*, *Funaria calvescens*, *Funaria convoluta*, *Funaria flavicans*, *Funaria groutiana*, *Funaria hygrometrica*, *Funaria hygrometrica* var. *arctica*, *Funaria hygrometrica* var. *calvescens*, *Funaria hygrometrica* var.  
35 40 *convoluta*, *Funaria hygrometrica* var. *muralis*, *Funaria hygrometrica* var. *utahensis*, *Funaria microstoma*, *Funaria microstoma* var. *obtusifolia*, *Funaria muhlenbergii*, *Funaria orcuttii*, *Funaria plano-convexa*, *Funaria polaris*, *Funaria ravenelii*, *Funaria rubriseta*, *Funaria serrata*, *Funaria sonorae*, *Funaria sublimbatus*, *Funaria tucsoni*, *Physcomitrella californica*, *Physcomitrella patens*, *Physcomitrella readeri*, *Physcomitrium australe*, *Physcomitrium californicum*, *Physcomitrium collenchymatum*,

- Physcomitrium coloradense*, *Physcomitrium cupuliferum*, *Physcomitrium drummondii*,  
*Physcomitrium eurystomum*, *Physcomitrium flexifolium*, *Physcomitrium hookeri*, *Phys-*  
*comitrium hookeri* var. *serratum*, *Physcomitrium immersum*, *Physcomitrium keller-*  
5 *manii*, *Physcomitrium megalocarpum*, *Physcomitrium pyriforme*, *Physcomitrium pyri-*  
*forme* var. *serratum*, *Physcomitrium rufipes*, *Physcomitrium sandbergii*, *Physcomitrium*  
*subsphaericum*, *Physcomitrium washingtoniense*, Geraniaceae wie die Gattungen  
Pelargonium, Cocos, Oleum z.B. die Gattungen und Arten *Cocos nucifera*, *Pelar-*  
*gonium grossularioides* oder *Oleum cocois* [Kokusnuss], Gramineae wie die Gattung  
Saccharum z.B. die Gattung und Art *Saccharum officinarum*, Juglandaceae wie die  
10 Gattungen Juglans, Wallia z.B. die Gattungen und Arten *Juglans regia*, *Juglans*  
*ailanthifolia*, *Juglans sieboldiana*, *Juglans cinerea*, *Wallia cinerea*, *Juglans bixbyi*,  
*Juglans californica*, *Juglans hindsii*, *Juglans intermedia*, *Juglans jamaicensis*, *Juglans*  
*major*, *Juglans microcarpa*, *Juglans nigra* oder *Wallia nigra* [Walnuss], Lauraceae Wie  
die Gattungen Persea, Laurus z.B. die Gattungen und Arten *Laurus nobilis* [Lorbeer],  
15 *Persea americana*, *Persea gratissima* oder *Persea persea* [Avocado], Leguminosae  
wie die Gattung Arachis z.B. die Gattung und Art *Arachis hypogaea* [Erdnuss], Lina-  
ceae wie die Gattungen Linum, Adenolinum z.B. die Gattungen und Arten *Linum usi-*  
*tatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*,  
*Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*,  
20 *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum*  
*pratense* oder *Linum trigynum* [Lein], Lythrarieae wie die Gattung Punica z.B. die  
Gattung und Art *Punica granatum* [Granatapfel], Malvaceae wie die Gattung Gossy-  
pium z.B. die Gattungen und Arten *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossy-*  
*pium barbadense*, *Gossypium herbaceum* oder *Gossypium thurberi* [Baumwolle],  
25 Marchantiaceae wie die Gattung Marchantia z.B. die Gattungen und Arten *Marchantia*  
*berteroana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, Musaceae wie die Gattung  
Musa z.B. die Gattungen und Arten *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*,  
*Musa* spp. [Banane], Onagraceae wie die Gattungen Camissonia, Oenothera z.B. die  
Gattungen und Arten *Oenothera biennis* oder *Camissonia brevipes* [Nachtkerze],  
30 Palmae wie die Gattung Elaeis z.B. die Gattung und Art *Elaeis guineensis* [Ölpalme],  
Papaveraceae wie die Gattung Papaver z.B. die Gattungen und Arten *Papaver orien-*  
*tale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [Mohn], Pedaliaceae wie die Gattung Sesamum  
z.B. die Gattung und Art *Sesamum indicum* [Sesam], Piperaceae wie die Gattungen  
Piper, Artanthe, Peperomia, Steffensia z.B. die Gattungen und Arten *Piper aduncum*,  
35 *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper*  
*longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Pepero-*  
*mia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata*. [Cayennepfeffer], Poaceae wie die  
Gattungen Hordeum, Secale, Avena, Sorghum, Andropogon, Holcus, Panicum, Oryza,  
Zea (Mais), Triticum z.B. die Gattungen und Arten *Hordeum vulgare*, *Hordeum juba-*  
40 *tum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon* *Hordeum aegiceras*,  
*Hordeum hexastichon*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*,  
*Hordeum secalinum* [Gerste], *Secale cereale* [Roggen], *Avena sativa*, *Avena fatua*,  
*Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [Hafer], *Sorghum bicolor*,  
*Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drum-*  
45 *mondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aethiopicum*, *Sorghum arundina-*

- ceum, *Sorghum caffrorum*, *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum subglabrescens*, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum miliaceum*, *Panicum militaceum* [Hirse],  
5 *Oryza sativa*, *Oryza latifolia* [Reis], *Zea mays* [Mais] *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* oder *Triticum vulgare* [Weizen], Porphyridiaceae wie die Gattungen Chroothece, Flintiella, Petrovanella, Porphyridium, Rhodella, Rhodosorus, Vanhoeffenia z.B. die Gattung und Art *Porphyridium cruentum*, Proteaceae wie die Gattung Macadamia z.B. die Gattung und  
10 Art *Macadamia intergrifolia* [Macadamia], Prasinophyceae wie die Gattungen Nephroselmis, Prasinococcus, Scherffelia, Tetraselmis, Mantonella, Ostreococcus z.B. die Gattungen und Arten *Nephroselmis olivacea*, *Prasinococcus capsulatus*, *Scherffelia dubia*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica*, Mantonella squamata, Ostreococcus tauri, Rubiaceae wie die Gattung Coffea z.B. die Gattungen und Arten Cofea spp.,  
15 *Coffea arabica*, *Coffea canephora* oder *Coffea liberica* [Kaffee], Scrophulariaceae wie die Gattung Verbascum z.B. die Gattungen und Arten *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum densiflorum*, *Verbascum lagurus*, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lychnitis*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum olympicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum phoenicum*, *Verbascum pulverulentum* oder *Verbascum thapsus* [Königs-kerze], Solanaceae wie die Gattungen Capsicum, Nicotiana, Solanum, Lycopersicon z.B. die Gattungen und Arten *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum frutescens* [Pfeffer], *Capsicum annuum* [Paprika], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana 25 sylvestris* [Tabak], *Solanum tuberosum* [Kartoffel], *Solanum melongena* [Aubergine] *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*, *Solanum integrifolium* oder *Solanum lycopersicum* [Tomate], Sterculiaceae wie die Gattung Theobroma z.B. die Gattung und Art *Theobroma cacao* [Kakao] oder Theaceae wie die Gattung Camellia z.B. die Gattung und Art *Camellia sinensis* [Tee].  
30 Vorteilhafte Mikroorganismen sind beispielweise Pilze ausgewählt aus der Gruppe der Familien Chaetomiaceae, Choanephoraceae, Cryptococcaceae, Cunninghamellaceae, Dematiaceae, Moniliaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Pythiaceae, Sacharomyctaceae, Saprolegniaceae, Schizosachromycetaceae, Sodariaceae oder Tuberculariaceae.  
35 Beispielhaft seien die folgenden Mikroorganismen genannt ausgewählt aus der Gruppe: Choanephoraceae wie den Gattungen Blakeslea, Choanephora z.B. die Gattungen und Arten *Blakeslea trispora*, *Choanephora cucurbitarum*, *Choanephora infundibulifera* var. *cucurbitarum*, Mortierellaceae wie der Gattung Mortierella z.B. die Gattungen und Arten *Mortierella isabellina*, *Mortierella polycephala*, *Mortierella 40 ramanniana*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella zonata*, Pythiaceae wie den Gattungen Phytiuum, Phytophthora z.B. die Gattungen und Arten *Pythium debaryanum*, *Pythium intermedium*, *Pythium irregularare*, *Pythium megalacanthum*, *Pythium paroecandrum*, *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinna-*

*momi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora lateralis*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora syringae*, *Saccharomyces* wie den Gattungen *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces* codes, *Yarrowia* z.B. die Gattungen und Arten *Hansenula anomala*, *Hansenula californica*, *Hansenula canadensis*, *Hansenula capsulata*, *Hansenula ciferrii*, *Hansenula glucozyma*, *Hansenula henricii*, *Hansenula holstii*, *Hansenula minuta*, *Hansenula non-fermentans*, *Hansenula philodendri*, *Hansenula polymorpha*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula subpelliculosa*, *Hansenula wickerhamii*, *Hansenula wingei*, *Pichia alcohophilic*, *Pichia angusta*, *Pichia anomala*, *Pichia bispora*, *Pichia burtonii*, *Pichia canadensis*, *Pichia capsulata*, *Pichia carsonii*, *Pichia cellobiosa*, *Pichia ciferrii*, *Pichia farinosa*, *Pichia fermentans*, *Pichia finlandica*, *Pichia glucozyma*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia haplophilic*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia jadinii*, *Pichia lindnerii*, *Pichia membranafaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia minuta* var. *minuta*, *Pichia minuta* var. *non-fermentans*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia pastoris*, *Pichia philodendri*, *Pichia pini*, *Pichia polymorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia sargentensis*, *Pichia stipitis*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia subpelliculosa*, *Pichia toletana*, *Pichia trehalophila*, *Pichia vini*, *Pichia xylosa*, *Saccharomyces aceti*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces capensis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces drosophilic*, *Saccharomyces elegans*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Saccharomyces hienipensis*, *Saccharomyces inusitatus*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces microellipsoides*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces ludwigii*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosacharomycetaceae* such as the genera *Schizosaccharomyces* e.g. the species *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*, *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe*, *Thraustochytriaceae* such as the genera *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* e.g. the species *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium mangrovei*, *Schizochytrium minutum*, *Schizochytrium octosporum*, *Thraustochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium amoeboides*, *Thraustochytrium antacticum*, *Thraustochytrium arudimentale*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium benthicola*, *Thraustochytrium globosum*, *Thraustochytrium indicum*, *Thraustochytrium kerguelense*, *Thraustochytrium kinnei*, *Thraustochytrium motivum*, *Thraustochytrium multirudimentale*, *Thraustochytrium pachydermum*, *Thraustochytrium proliferum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium rossii*, *Thraustochytrium striatum* oder *Thraustochytrium visurgense*.

Weitere vorteilhafte Mikroorganismen sind beispielweise Bakterien ausgewählt aus der Gruppe der Familien Bacillaceae, Enterobacteriaceae oder Rhizobiaceae.

Beispielhaft seien die folgenden Mikroorganismen genannt ausgewählt aus der Gruppe: Bacillaceae wie die Gattung *Bacillus* z.B die Gattungen und Arten *Bacillus*

5 *acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amylolyticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sphaericus* subsp. *fusiformis*, *Bacillus galactophilus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus globisporus* subsp. *marinus*, *Bacillus halophilus*, *Bacillus lenticmorbus*, *Bacillus lentinus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus*

10 *subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* oder *Bacillus thuringiensis*; Enterobacteriaceae wie die Gattungen *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* oder *Serratia* z.B die Gattungen und Arten *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter genmospecies*, *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter intermedium*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murliniae*, *Citrobacter sp.*, *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia alni*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia ananatis*, *Erwinia aphidicola*, *Erwinia billingiae*, *Erwinia cacticida*, *Erwinia cancerogena*, *Erwinia carnegieana*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum*, *Erwinia carotovora*

20 subsp. *odorifera*, *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia cypripedii*, *Erwinia dissolvens*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia mallotivora*, *Erwinia milletiae*, *Erwinia nigrifluens*, *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia persicina*, *Erwinia psidii*, *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia quercina*, *Erwinia rhamontici*, *Erwinia rubrifaciens*, *Erwinia salicis*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tracheiphila*, *Erwinia uredovora*, *Escherichia adcarboxylata*,

25 *Escherichia anindolica*, *Escherichia aurescens*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* var. *communior*, *Escherichia coli-mutabile*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia sp.*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella edwardsii* subsp. *atlantae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*,

30 *Klebsiella sp.*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella trevisanii*, *Salmonella abony*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*, *Salmonella*

*choleraesuis* subsp. *bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *cholereasuis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *houtenae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *indica*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *salamae*, *Salmonella*

35 *daressalaam*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*, *Salmonella enterica* subsp. *salmiae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella panama*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia entomophila*,

*Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Serratia marinorubra*, *Serratia*

40 *odorifera*, *Serratia plymuthensis*, *Serratia plymuthica*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora*, *Serratia quinivorans* oder *Serratia rubidaea*; Rhizobiaceae wie die Gattungen *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* z.B. die Gattungen und Arten *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium gelatinovorum*, *Agrobacterium*

*larrymoorei*, *Agrobacterium meteori*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Carbophilus carboxidus*, *Chelatobacter heintzii*, *Ensifer adhaerens*, *Ensifer arboris*, *Ensifer fredii*, *Ensifer kostiensis*, *Ensifer kummerowiae*, *Ensifer medicae*, *Ensifer meliloti*, *Ensifer saheli*, *Ensifer terangae*, *Ensifer xinjiangensis*, *Rhizobium ciceri* *Rhizobium etli*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium loessense*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium mediterraneum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium sullae*, *Rhizobium tianshanense*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium vitis*, *Sinorhizobium adhaerens*, *Sinorhizobium arboris*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium kostiense*, *Sinorhizobium kummerowiae*, *Sinorhizobium medicae*, *Sinorhizobium meliloti*,

- 5 *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium saheli* oder *Sinorhizobium xinjiangense*.
- 10 Weitere vorteilhafte Mikroorganismen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielweise Protisten oder Diatomeen ausgewählt aus der Gruppe der Familien Dinophyceae, Turaniellidae oder Oxytrichidae wie die Gattungen und Arten: *Cryptocodinium cohnii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Stylonychia mytilus*, *Stylonychia pustulata*,
- 15 20 *Stylonychia putrina*, *Stylonychia notophora*, *Stylonychia sp.*, *Colpidium campylum* oder *Colpidium sp.*

- Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Organismen wie Pilze wie Mortierella oder Thraustochytrium, Hefen wie Saccharomyces oder Schizosaccharomyces, Moose wie Physcomitrella oder Ceratodon, nicht-humane Tiere wie Caenorhabditis, Algen wie Cryptocodinium oder Phaeodactylum oder Pflanzen wie zweikeimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen verwendet. Besonders vorteilhaft werden Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet, die zu den Ölproduzierenden Organismen gehören, das heißt die für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie Pilze wie Mortierella oder Thraustochytrium, Algen wie Cryptocodinium, Phaeodactylum oder Pflanzen, insbesondere Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Mohn, Senf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königsckerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss oder Walnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind C18:2- und/oder C18:3-Fettsäure reiche Pflanzen wie Sonnenblume, Färberdistel, Tabak, Königsckerze, Sesam, Baumwolle,

Kürbis, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nacht-kerze, Walnuss, Lein oder Hanf.

Für das erfindungsgemäß beschriebene Verfahren ist es vorteilhaft, in den Organismus 5 zusätzlich zu den im Verfahren eingebrachten Nukleinsäuresequenzen, die für eine ω-3-Desaturase codieren, weitere Nukleinsäuren einzubringen, die für Enzyme des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren.

Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels vorteilhaft in Kombination mit der erforderlichen ω-3-Desaturase im Verfahren zur Herstellung 10 mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden vorteilhaft werden Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylensasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) in Kombination mit der ω-3-Desaturase verwendet. Besonders bevorzugt werden Gene ausgewählt aus der Gruppe der Δ-4-Desaturasen, 15 Δ-5-Desaturasen, Δ-6-Desaturasen, Δ-8-Desatasen, Δ-9-Desaturasen, Δ-12-Desurasen, Δ-5-Elongasen, Δ-6-Elongasen oder Δ-9-Elongasen in Kombination mit den vorgenannten Genen für die ω-3-Desaturase verwendet, wobei einzelne Gene oder mehrere Gene in Kombination verwendet werden können.

Die erfindungsgemäße ω-3-Desaturase hat gegenüber den bekannten ω-3-Desaturase 20 die vorteilhafte Eigenschaft, dass sie ein breites Spektrum an ω-6-Fettsäuren desaturieren kann, bevorzugt werden C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Fettsäuren wie C<sub>20:2</sub>-, C<sub>20:3</sub>-, C<sub>20:4</sub>-, C<sub>22:4</sub>- oder C<sub>22:5</sub>-Fettsäuren desaturiert. Aber auch die kürzeren C<sub>18</sub>-Fettsäuren wie C<sub>18:2</sub>- oder C<sub>18:3</sub>-Fettsäuren werden vorteilhaft desaturiert. Durch diese Eigenschaften der ω-3-Desaturase ist es vorteilhaft möglich das Fettsäurespektrum innerhalb eines 25 Organismus vorteilhaft innerhalb einer Pflanze oder einem Pilz von den ω-6-Fettsäuren zu den ω-3-Fettsäuren hin zu verschieben. Bevorzugt werden von der erfindungsgemäßen ω-3-Desaturase C<sub>20</sub>-Fettsäuren desaturiert. Innerhalb des Organismus werden diese Fettsäuren aus dem vorhandenen Fettsäurepool zu mindestens 10 %, 30 15 %, 20 %, 25 % oder 30 % zu den entsprechenden ω-3-Fettsäuren umgesetzt. Gegenüber den C<sub>18</sub>-Fettsäuren weist die ω-3-Desaturase eine um den Faktor 10 geringere Aktivität auf, das heißt es werden nur ca. 1,5 bis 3 % der im Fettsäurepool 35 vorhandenen Fettsäuren zu den entsprechenden ω-3-Fettsäuren umgesetzt. Bevorzugtes Substrat der erfindungsgemäßen ω-3-Desaturase sind die in Phospholipiden gebundenen ω-6-Fettsäuren. Figur 9 zeigt deutlich am Beispiel der Desaturierung von Dihomo-γ-linolensäure [C<sub>20:4</sub><sup>Δ8,11,14</sup>], dass die ω-3-Desaturase bei der Desaturierung 40 vorteilhaft nicht zwischen an sn1- oder sn2-Position gebundenen Fettsäuren unterscheidet. Sowohl an sn1- oder sn2-Position in den Phospholipide gebundene Fettsäuren werden desaturiert. Weiterhin ist vorteilhaft, dass die ω-3-Desaturase eine

breite Palette von Phospholipiden wie Phosphatidylcholin (= PC), Phosphatidylinositol (= PIS) oder Phosphatidylethanolamin (= PE) umsetzt. Schließlich lassen sich auch Desaturierungsprodukte in den Neutrallipiden (= NL), das heißt in den Triglyceriden finden.

- 5 Durch die enzymatische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie weiteren Polypeptiden mit  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6-,  $\Delta$ -8-Desaturase- oder  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6- oder  $\Delta$ -9-Elongaseaktivität codieren, können unterschiedlichste mehrfach ungesättigte Fettsäuren im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden.
- 10 Je nach Auswahl der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Organismen wie den vorteilhaften Pflanze lassen sich Mischungen der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA oder DHA in freier oder gebundener Form herstellen. Je nachdem welche Fettsäurezusammensetzung in der Ausgangspflanze vorherrscht (C18:2- oder C18:3-Fettsäuren) entstehen so Fettsäuren, die sich von C18:2-Fettsäuren ableiten, wie GLA, DGLA oder ARA oder, die sich von C18:3-Fettsäuren ableiten, wie SDA, ETA oder EPA. Liegt in der für das Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur Linolsäure (= LA, C18:2<sup>19,12</sup>) vor, so können als Produkte des Verfahrens zunächst nur GLA, DGLA und ARA entstehen, die als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Durch die Aktivität der erfindungsgemäßen  $\omega$ -3-Desaturase können aus diesen schließlich  $\omega$ -3-Fettsäuren synthetisiert werden. Ist in der im Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA, C18:3<sup>19,12,15</sup>) beispielsweise wie in Lein, so können als Produkte des Verfahrens nur SDA, ETA, EPA und/oder DHA entstehen, die wie oben beschrieben als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Durch Modifikation der Aktivität des an der Synthese beteiligten Enzyms  $\omega$ -3-Desaturase vorteilhaft in Kombination mit der  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6-Desaturase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\Delta$ -5-Elongase, oder der  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -8-Desaturase, und/oder  $\Delta$ -9-Elongase und/oder  $\Delta$ -5-Elongase lassen sich gezielt in den vorgenannten Organismen vorteilhaft in den vorgenannten Pflanzen nur einzelne Produkte herstellen. Durch die Aktivität der  $\Delta$ -6-Desaturase und  $\Delta$ -6-Elongase entstehen beispielsweise GLA und DGLA bzw. SDA und ETA, je nach Ausgangspflanze und ungesättigter Fettsäure. Bevorzugt entstehen DGLA bzw. ETA oder deren Mischungen. Werden die  $\Delta$ -5-Desaturase, die  $\Delta$ -5-Elongase und die  $\Delta$ -4-Desaturase zusätzlich in die Organismen vorteilhaft in die Pflanze eingebracht, so entstehen zusätzlich ARA, EPA und/oder DHA. Dies gilt auch für Organismen in die vorher die  $\Delta$ -8-Desaturase und  $\Delta$ -9-Elongase eingebracht wurde. Vorteilhaft werden nur ARA, EPA oder DHA oder deren Mischungen besonders vorteilhaft nur EPA oder DHA oder deren Mischungen synthetisiert, abhängig von der in im Organismus bzw. in der Pflanze vorliegenden Fettsäure, die als Ausgangssubstanz für die Synthese dient. Da es sich um Biosyntheseketten handelt, liegen die jeweiligen Endprodukte nicht als Reinsubstanzen in den Organismen vor. Es sind immer auch geringe Mengen der Vorläuferverbindungen im Endprodukt enthalten. Diese geringen Mengen betragen weniger als 20 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 15 Gew.-%, besonders vorteilhaft

weniger als 10 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 5, 4, 3, 2 oder 1 Gew.-% bezogen auf das Endprodukt DGLA, ETA oder deren Mischungen bzw. ARA, EPA, DHA oder deren Mischungen vorteilhaft EPA oder DHA oder deren Mischungen.

- 5 Neben der Produktion der Ausgangsfettsäuren für die erfindungsgemäße  $\omega$ -3-Desaturase direkt im Organismus können die Fettsäuren auch von außen gefüttert werden. Aus kostengründen ist die Produktion im Organismus bevorzugt. Bevorzugt Substrate der  $\omega$ -3-Desaturase sind die Linolsäure ( $C18:2^{\Delta 9,12}$ ), die  $\gamma$ -Linolensäure ( $C18:3^{\Delta 6,9,12}$ ), die Eicosadiensäure ( $C20:2^{\Delta 11,14}$ ), die Dihomo- $\gamma$ -linolensäure ( $C20:3^{\Delta 8,11,14}$ ), die Arachidonsäure ( $C20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ ), die Docosatetraensäure ( $C22:4^{\Delta 7,10,13,16}$ ) und die Docosapentaensäure ( $C22:5^{\Delta 4,7,10,13,15}$ ).
- 10

- 15 Zur Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist es vorteilhaft die Menge an Ausgangsprodukt für die Fettsäuresynthese zu steigern, dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure in den Organismus, die für ein Polypeptid mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codiert, erreicht werden. Dies ist besonders vorteilhaft in Öl-produzierenden Organismen wie Raps, die einen hohen Ölsäuregehalt aufweisen. Da diese Organismen nur einen geringen Gehalt an Linolsäure aufweisen (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681) ist die Verwendung der genannten  $\Delta$ -12-Desaturasen zur Herstellung des Ausgangsprodukts Linolsäure vorteilhaft.
- 20

- 25 Im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren stammen vorteilhaft aus Pflanzen wie Algen wie Isochrysis, Mantoniella, Ostreococcus oder Cryptecodinium, Algen/Diatomeen wie Phaeodactylum oder Thraustochytrium, Moose wie Physcomitrella oder Ceratodon oder höheren Pflanzen wie den Primulaceae wie Aleuritia, Calendula stellata, Osteospermum spinescens oder Osteospermum hyoseroides, Mikroorganismen wie Pilzen wie Aspergillus, Thraustochytrium, Phytophthora, Entomophthora, Mucor oder Mortierella, Bakterien wie Shewanella, Hefen oder Tieren wie Nematoden wie Caenorhabditis, Insekten oder Fischen. Vorteilhaft stammen die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Tier aus der Ordnung der Vertebraten. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Klasse der Vertebrata; Euteleostomi, Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei, Pro-tacanthopterygii, Salmoniformes; Salmonidae bzw. Oncorhynchus. Besonders vorteilhaft stammen die Nukleinsäuren aus Pilzen, Tieren oder aus Pflanzen wie Algen oder Moosen, bevorzugt aus der Ordnung der Salmoniformes wie der Familie der Salmonidae wie der Gattung Salmo beispielsweise aus den Gattungen und Arten Oncorhynchus mykiss, Trutta trutta oder Salmo trutta fario oder aus den Diatomeen wie den Gattungen Thallasiosira oder Cryptecodinium.
- 30
- 35

- 40 Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen oder deren Derivat oder Homologe, die für Polypeptide codieren, die noch die enzymatische Aktivität der durch Nukleinsäuresequenzen codierten Proteine be-

sitzen. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den für die  $\omega$ -3-Desaturase codierenden Nukleinsäuresequenzen in Expressionskonstrukte cloniert und zum Einbringen und zur Expression in Organismen verwendet. Diese Expressionskonstrukte ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle oder eines ganzen Organismus, der die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei die Zelle und/oder der Organismus mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die für die  $\omega$ -3-Desaturase

codiert, einem Genkonstrukt oder einem Vektor wie nachfolgend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fett- säure- oder Lipidsstoffwechsels codieren, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus dem Organismus oder aus der Kultur. Bei

der Kultur kann es sich beispielsweise um eine Fermentationskultur beispielsweise im Falle der Kultivierung von Mikroorganismen wie z.B. Mortierella, Saccharomyces oder Thraustochytrium oder um eine Treibhaus- oder Feldkultur einer Pflanze handeln.

Die so hergestellte Zelle oder der so hergestellte Organismus ist vorteilhaft eine Zelle eines Öl-produzierenden Organismus wie einer Ölfruchtpflanze wie beispielsweise

Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Safflower, Hanf, Sonnenblumen oder Borretsch.

Unter Anzucht ist beispielsweise die Kultivierung im Falle von Pflanzenzellen, -gewebe oder -organe auf oder in einem Nährmedium oder der ganzen Pflanze auf bzw. in einem Substrat beispielsweise in Hydrokultur, Blumentopferde oder auf einem Acker- boden zu verstehen.

"Transgen" bzw. "Rekombinant" im Sinne der Erfindung bedeutet bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder

35 c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen

genomischen bzw. chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an

- 5 einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promoters der erfundungsgemäßigen Nukleinsäuresequenzen mit den entsprechenden  $\omega$ -3-Desaturasegenen -  
10 wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

Unter transgenen Organismus bzw. transgener Pflanze im Sinne der Erfindung ist wie vorgenannt zu verstehen, dass die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch wie genannt, dass die erfundungsgemäßigen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen

- 20 Sequenz verändert wurde und/oder das die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfundungsgemäßigen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Organismen sind Pilze wie Mortierella, Moose wie Physcomitrella, Algen wie Cryptothecodium oder Pflanzen wie die Ölfruchtpflanzen.  
25

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die im erfundungsgemäßigen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die Expressionskassette oder den Vektor eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie Brassicaceae wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung Mortierella, Thraustochytrium, Saprolegnia oder Pythium, Bakterien wie die Gattung Escherichia

- 30 oder Shewanella, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Cyanobakterien, Ciliaten, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie Cryptothecodium genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie Mortierella alpina, Pythium insidiosum oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakao-  
35 bohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Flachs, Raps, Färbersafflor, Sonnenblume, Calendula, Mortierella oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen neben den
- 40

vorgenannten transgenen Organismen auch transgene Tiere vorteilhaft nicht-humane Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*.

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

- 5 Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

Hierzu gehören Pflanzenzellen und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von Pflanzen in all ihren Erscheinungsformen, wie Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe und Zellkulturen, das von der eigentlichen transgenen Pflanze abgeleitet ist und/oder dazu verwendet werden kann, die transgene Pflanze hervorzu-bringen.

10 Transgene Pflanzen, die die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, können vorteilhaft direkt vermarktet werden ohne dass, die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen.

Unter Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren sind ganze Pflanzen sowie alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile wie Blatt, Stiel, Samen, Wurzel, Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe, Zellkulturen, die sich von der transgenen Pflanze abgeleiten und/oder dazu verwendet werden können, die transgene Pflanze hervorzubringen. Der Samen umfasst dabei alle Samenteile wie die Samenhüllen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder Embryogewebe. Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen können aber auch aus den Organismen vorteilhaft Pflanzen in Form ihrer Öle, Fett, Lipide und/oder freien Fettsäuren isoliert werden. Durch dieses Verfahren hergestellte mehrfach ungesättigten Fettsäuren lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder vom Feld ernten. Dies kann über Pressen oder

20 Extraktion der Pflanzenteile bevorzugt der Pflanzensamen erfolgen. Dabei können die Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren durch sogenanntes kalt schlagen oder kalt pressen ohne Zuführung von Wärme durch Pressen gewonnen werden. Damit sich die Pflanzenteile speziell die Samen leichter aufschließen lassen, werden sie vorher zerkleinert, gedämpft oder geröstet. Die so vorbehandelten Samen können anschließend gepresst werden oder mit Lösungsmittel wie warmen Hexan extrahiert werden. Anschließend wird das Lösungsmittel wieder entfernt. Im Falle von Mikro-

25 organismen werden diese nach Ernte beispielsweise direkt ohne weitere Arbeitsschritte extrahiert oder aber nach Aufschluss über verschiedene dem Fachmann bekannte Methoden extrahiert. Auf diese Weise können mehr als 96 % der im Verfahren hergestellten Verbindungen isoliert werden. Anschließend werden die so erhaltenen

30 Produkte weiter bearbeitet, das heißt raffiniert. Dabei werden zunächst beispielsweise die Pflanzenschleime und Trübstoffe entfernt. Die sogenannte Entschleimung kann enzymatisch oder beispielsweise chemisch/physikalisch durch Zugabe von Säure wie

matisch oder beispielsweise chemisch/physikalisch durch Zugabe von Säure wie Phosphorsäure erfolgen. Anschließend werden die freien Fettsäuren durch Behandlung mit einer Base beispielsweise Natronlauge entfernt. Das erhaltene Produkt wird zur Entfernung der im Produkt verbliebenen Lauge mit Wasser gründlich gewaschen

- 5 und getrocknet. Um die noch im Produkt enthaltenen Farbstoffe zu entfernen werden die Produkte einer Bleichung mit beispielsweise Bleicherde oder Aktivkohle unterzogen. Zum Schluss wird das Produkt noch beispielsweise mit Wasserdampf noch desodoriert.

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAAs bzw. LCPUFAAs

- 10 C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

- 15 Eine Ausführungsform der Erfindung sind deshalb Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

- 20 Diese Öle, Lipide oder Fettsäuren enthalten wie oben beschrieben vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische bevorzugt mindestens 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enon-säure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopenten-dodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienon-säure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynon-säure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diynonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatrien-säure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Vorteilhaft ent-

halten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren oder keine Butterbuttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5<sup>A4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>A3,8,12,15,18,21</sup>).

- 5 Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäßen Öle, Lipide oder Fettsäuren mindestens 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % oder 5 %, vorteilhaft mindestens 6 %, 7 %, 8 %, 9 % oder 10 %, besonders vorteilhaft mindestens 11 %, 12 %, 13 %, 14 % oder 15 % ARA oder mindestens 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % oder 5 %, vorteilhaft mindestens 6 %, oder 7 %, besonders vorteilhaft mindestens 8 %, 9 % oder 10 % EPA und/oder DHA bezogen  
10 auf den Gesamtfettsäuregehalt des Produktionsorganismus vorteilhaft einer Pflanze, besonders vorteilhaft einer Ölfruchtpflanze wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne, Sonnenblume oder den oben genannten weiteren ein- oder zweikeimblättrigen Ölfruchtpflanzen.

15 Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. Die erfindungsgemäßen Öle, Lipide, Fett säuren oder Fettsäuregemische können in der dem Fachmann bekannten Weise zur Abmischung mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs wie z.B. Fischölen verwendet werden.

20 Unter dem Begriff "Öl", "Lipid" oder "Fett" wird ein Fettsäuregemisch verstanden, das ungesättigte, gesättigte, vorzugsweise veresterte Fettsäure(n) enthält. Bevorzugt ist, dass das Öl, Lipid oder Fett einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten freien oder vorteilhaft veresterten Fettsäure(n), insbesondere Linolsäure, γ-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Arachidonsäure, α-Linolensäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure, 25 Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure hat. Vorzugsweise ist der Anteil an ungesättigten veresterten Fettsäuren ungefähr 30 %, mehr bevorzugt ist ein Anteil von 50 %, noch mehr bevorzugt ist ein Anteil von 60 %, 70 %, 80 % oder mehr. Zur Bestimmung kann z.B. der Anteil an Fettsäure nach Überführung der Fettsäuren in die Methylestern durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. Calendulasäure, Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Ölsäure etc., enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangsorganismus der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.

30 35 Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, handelt es sich wie oben beschrieben beispielsweise um Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder sonstige Fettsäureester.

40 Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren beispielsweise über eine Alkali-behandlung beispielsweise wäßrige KOH oder NaOH oder saure Hydrolyse vorteilhaft

in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol oder über eine enzymatische Abspaltung freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließender Ansäuerung über z.B. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Freisetzung der Fettsäuren kann auch direkt ohne die vorhergehend beschriebene Aufarbeitung erfolgen.

- 5      Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder auf einem separaten Plasmid liegen oder vorteilhaft in das Genom der Wirtszelle integriert sein. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt
- 10     wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionalen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist. Vorteilhaft
- 15     werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multiparallelen Expression in die Organismen vorteilhaft zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genen in die Pflanzen gebracht.

- Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFA's in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFA's in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFA's auch in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren, besonders vorteilhaft für das erfindungsgemäße Verfahren und damit zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Hanf, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar.

- Als Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit ω-3-Desaturase-Aktivität codieren, und/oder den weiteren verwendeten Nukleinsäuren wie den Nukleinsäuren, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) codieren eignen sich vorteilhaft C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren. Bevorzugt werden die im Verfahren als Substrate umgesetzten Fettsäuren in Form ihrer Phospholipid-Ester umgesetzt.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langketten PUFA's müssen die mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase zunächst desaturiert und anschließend über eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzym-

- 5 aktivität zu C<sub>20</sub>-Fettsäuren, und nach zwei Elongationsrunden zu C<sub>22</sub>-Fettsäuren. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Verfahren verwenden Desaturasen und Elongasen führt vorzugsweise zu C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren vorteilhaft mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit 10 mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, ganz besonders bevorzugt mit vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Molekül. Nachdem eine erste Desaturierung und die Verlängerung stattgefunden hat, können weitere Desaturierungs- und Elongierungsschritte wie z.B. eine solche Desaturierung in Δ-5- und Δ-4-Position in erfolgen. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Eicosatriensäure, die Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahesaensäure. Die C<sub>20</sub>- 15 Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die enzymatische Aktivität der im Verfahren verwendeten Enzyme in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, 20 Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Der bevorzugte Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen, Lipiden oder Fette in den vorteilhaft verwendeten Pflanzen ist beispielsweise im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Expression der im Verfahren 25 verwendeten Nukleinsäuren sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, dass die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muss, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.

- 30 Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismen wie Hefen wie Saccharomyces oder Schizosaccharomyces, Pilze wie Mortierella, Aspergillus, Phytophtora, Entomophthora, Mucor oder Thraustochytrium Algen wie Isochrysis, Phaeodactylum oder Cryptocodon verwendet, so werden diese Organismen vorteilhaft fermentativ angezogen.

- 35 Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für eine ω-3-Desaturase codieren, können im Verfahren die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens um 5 %, bevorzugt mindestens um 10 %, besonders bevorzugt mindestens um 20 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50 % gegenüber dem Wildtyp der Organismen, die die Nukleinsäuren nicht rekombinant enthalten, erhöht werden.

- 40 Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den im Verfahren verwendeten Organismen prinzipiell auf zwei

Arten erhöht werden. Es kann vorteilhaft der Pool an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder der Anteil der über das Verfahren hergestellten veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöht werden. Vorteilhaft wird durch das erfindungsgemäße Verfahren der Pool an veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den transgenen Organismen erhöht.

- 5 Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismen verwendet, so werden sie je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle 10 meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder aber auch nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi 15 batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren können nach dem Fachmann bekannten Verfahren wie oben beschrieben aus den Organismen isoliert werden.
- 20 Beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, ggf. Salzfällung und/oder Chromatographie. Die Organismen können dazu vorher noch vorteilhaft aufgeschlossen werden.

- Das erfindungsgemäße Verfahren wird, wenn es sich bei den Wirtsorganismen um Mikroorganismen handelt, vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 95°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 85°C, besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 75°C, ganz 25 besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 45°C durchgeführt.

Der pH-Wert wird dabei vorteilhaft zwischen pH 4 und pH 12, bevorzugt zwischen pH 6 und pH 9, besonders bevorzugt zwischen pH 7 und pH 8 gehalten.

- 30 Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.
- 35 Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen wie oben beschrieben gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr

5 gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mög-

10 liche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und/oder Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und/oder Linolsäure, Alkohole und/oder Polyalkohole wie z.B. Glycerin, Methanol und/oder Ethanol und/oder organische Säuren wie z.B. Essigsäure und/oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffver-

15 bindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak in flüssiger- oder gasform oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die

20 Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

Als Schwefelquelle für die Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, ins-

25 besondere von Methionin, können anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder

30 Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

Die erfindungsgemäß zur Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine

35 oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies

## 31

geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg.

- 5 P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zu-

- 10 zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experiments konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht durch Zugabe von basischen Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder sauren Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Anti-

- 20 schaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z.B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z.B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normaler-

- 25 weise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen, insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthaltenden, Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

- 30 Die Fermentationsbrühe kann anschließend weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Vorteilhaft wird die Biomasse nach Abtrennung aufgearbeitet.

- 35 Die Fermentationsbrühe kann aber auch ohne Zellabtrennung mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnsschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrsmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann schließlich zur Gewinnung der darin enthaltenen Fettsäuren aufgearbeitet werden.

Die im Verfahren gewonnenen Fettsäuren eignen sich auch als Ausgangsmaterial für die chemische Synthese von weiteren Wertprodukten. Sie können beispielsweise in Kombination miteinander oder allein zur Herstellung von Pharmaka, Nahrungsmittel, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

- 5 Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit ω-3-Desaturase-Aktivität codieren, werden vorteilhaft allein oder bevorzugt in Kombination mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder einem Mikroorganismus ermöglicht, eingebracht.
- 10 Zum Einbringen werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerasegemisches vor. Die Primer werden in Anlehnung an die zu amplifizierende Sequenz gewählt. Zweckmäßigerweise sollten die Primer so gewählt werden, dass das Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann die Analyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung hinsichtlich Qualität und Quantität erfolgen. Im Anschluss kann das Amplifikat nach einem Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifikats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung. Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilze gewährleisten, und die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobakterium-vermittelte Transformation benötigten vir-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promotoren und Terminatoren und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen vir-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer vir-Gene, aber keine T-DNA und ein zweiter T-DNA, jedoch kein vir-Gen trägt. Dadurch sind letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in E.-coli als auch in Agrobacterium zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451.
- 15 20 25 30 35 40 Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittenen und erforderlichenfalls gereinigte

Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten mit Einsatz von Ligase kloniert. Dabei kann ein bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt einen oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen. Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen

- 5 funktional verknüpft. Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie die oben beschriebenen Promotoren und Terminatoren. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in Mikroorganismen, insbesondere Escherichia coli und Agrobacterium tumefaciens, unter selektiven Bedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen.

10

Unter der vorteilhaften Verwendung von Klonierungsvektoren können die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte in Organismen wie Mikroorganismen oder vorteilhaft Pflanzen eingebracht werden und damit bei der Pflanzentransformation verwendet werden, wie denjenigen,

- 15 die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utili-

20 zation, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu.

Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225)). Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren lassen sich damit zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Organismen vorteilhaft an Pflanzen verwenden, so dass

25 diese bessere und/oder effizientere Produzenten von PUFAs werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die eine Veränderung des erfindungsgemäßen  $\omega$ -3-Desaturase-Proteins sowie der weiteren im Verfahren verwendeten Proteine wie die  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Proteine möglich ist, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der vorteilhaft mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer Pflanze bevorzugt in einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund dieses veränderten Proteins direkt beeinflusst werden kann.

Die Anzahl oder Aktivität der  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-

- 30 Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase- oder  $\omega$ -3-Desaturase-Proteine oder -Gene kann erhöht werden, so dass größere Mengen der Genprodukte und damit letztlich größere Mengen der Verbindungen der allgemeinen Formel I hergestellt werden. Auch eine de novo Synthese in einem Organismus, dem die Aktivität

35 und Fähigkeit zur Biosynthese der Verbindungen vor dem Einbringen des/der entsprechenden Gens/Gene fehlte, ist möglich. Entsprechendes gilt für die Kombination

- 40 mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Fettsäure- und Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression

z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglicht.

Durch das Einbringen eines Δ-9-Elongase-, Δ-6-Desaturase-, Δ-8-Desaturase-, Δ-6-Elongase-, Δ-5-Desaturase-, Δ-5-Elongase-, Δ-4-Desaturase- und/oder ω-3-

- 5 Desaturase-Genes in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Fettsäuren, Ölen, polaren  
10 und/oder neutralen Lipiden nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFA's, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer Δ-9-Elongase-, Δ-6-Desaturase-, Δ-8-Desaturase-, Δ-6-Elongase-, Δ-5-Desaturase-, Δ-5-Elongase-, Δ-4-Desaturase- oder ω-3-Desaturase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen  
15 beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen  
20 und vorteilhaft aus Pflanzen zu steigern.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten isolierten Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine oder Teile von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz ist, die in den Sequenzen SEQ ID NO: 2 dargestellt ist,

- 25 so dass die Proteine oder Teile davon noch eine ω-3-Desaturase-Desaturase-Aktivität aufweisen. Vorzugsweise haben die Proteine oder Teile davon, die von dem Nukleinsäuremolekül/den Nukleinsäuremolekülen kodiert wird/werden, noch seine wesentliche enzymatische Aktivität und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen oder Lipidkörperchen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen notwendigen  
30 Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Vorteilhaft sind die von den Nukleinsäuremolekülen kodierten Proteine zu mindestens etwa 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr identisch zu der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz. Im Sinne der Erfindung ist unter Homologie oder homolog, Identität oder identisch zu verstehen.

Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al.,

CABIOS, 5 1989: 151–153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)], die im GCG Software-Packet [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben

5 in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Diese Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, immer als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet.

10 Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten ω-3-Desaturase ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz mit SEQ ID NO: 1 und deren Derivate codierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch mindestens eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % und ganz besonders 40 % aufweisen und damit

15 am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureester wie Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Stellen

20 gemeint sind.

Vorteilhaft im Verfahren verwendbare Nukleinsäuren stammen aus Bakterien, Pilzen, Diatomeen, Tieren wie Caenorhabditis oder Pflanzen wie Algen oder Moosen wie den Gattungen Shewanella, Physcomitrella, Thraustochytrium, Fusarium, Phytophthora, Ceratodon, Isochrysis, Aleurita, Muscarioides, Mortierella, Phaeodactylum, Crypthe-

25 codinium, speziell aus den Gattungen und Arten Thallasiosira pseudonona, Euglena gracilis, Physcomitrella patens, Phytophthora infestans, Fusarium gramineum, Cryptocodium cohnii, Ceratodon purpureus, Isochrysis galbana, Aleurita farinosa, Thraustochytrium sp., Muscarioides vallii, Mortierella alpina, Phaeodactylum tricornutum oder Caenorhabditis elegans oder besonders vorteilhaft Phytophthora infestans, Thallasiosira pseudonona oder Cryptocodium cohnii.

30 Alternativ können im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für ω-3-Desaturase codieren und die an eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO: 1 dargestellt, vorteilhaft unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

35 Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Organismen wie Mikroorganismen oder Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

40 Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für die ω-3-Desaturase codieren, mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert

und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder

5 anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette (= Expressionskonstrukt = Genkonstrukt) kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine

10 zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Statt dessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäß

15 Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen.

Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen 20 inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die ω-3-Desaturase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Gleches gilt für die weiteren Gene der Fettsäurebiosynthese, die in Kombination mit der erfindungsgemäßω-3-Desaturase verwendet werden. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette

25 vor. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.

30 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die 35 eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 1 oder dessen Derivate definiert sind und für Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2 kodieren. Die genannten ω-3-Desaturase-Proteine führen dabei vorteilhaft zu einer Desaturierung von ω-6-Fettsäuren, wobei das Substrat vorteilhaft zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen aufweist und vorteilhaft 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatome im Fettsäuremolekül aufweist. Gleches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem

oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Gen-expression, verbunden sind.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-,

- 5 T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-PR- oder λ-PL-Promotor und werden vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFα, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21 (1980)  
10 285–294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397–404 (Gatz et al., Tetracyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP Promotor aber auch andere Promotoren wie der LeB4-, DC3, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder  
25 dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus Arobidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233–239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen Ipt-2- oder Ipt-1-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.  
30

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. beschrieben in WO 99/16890.

Um einen besonders hohen Gehalt an PUFA's vor allem in transgenen Pflanzen zu erzielen, sollten die ω-3-Desaturase- und/oder PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft samenspezifisch in Ölsaaten exprimiert werden. Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samen-spezifische Promotoren können prinzipiell sowohl aus

dikotolydonen als auch aus monokotolydonen Pflanzen isoliert werden. Im folgenden sind vorteilhafte bevorzugte Promotoren aufgeführt: USP (= unknown seed protein) und Vicilin (*Vicia faba*) [Bäumlein et al., Mol. Gen Genet., 1991, 225(3)], Napin (Raps) [US 5,608,152], Acyl-Carrier Protein (Raps) [US 5,315,001 und WO 92/18634], Oleosin

- 5 (Arabidopsis thaliana) [WO 98/45461 und WO 93/20216], Phaseolin (*Phaseolus vulgaris*) [US 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], Leguminosen B4 (LegB4-Promotor) [Bäumlein et al., Plant J., 2,2, 1992], Lpt2 und Ipt1(Gerste) [WO 95/15389 und WO95/23230], Samen-spezifische Promotoren aus Reis, Mais u. Weizen [WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 und Aleurain [US 5,677,474], Bce4 (Raps) [US 5,530,149], Glycinin (Soja)
- 10 [EP 571 741], Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase (Soja) [JP 06/62870], ADR12-2 (Soja) [WO 98/08962], Isocitrattyase (Raps) [US 5,689,040] oder  $\alpha$ -Amylase (Gerste) [EP 781 849].

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant

- 15 Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt.

Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

20 Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\omega$ -3-Desaturase- oder weitere Gene der Fettsäurebiosynthese wie  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase codieren, unter der Kontrolle eines eigenen bevorzugt eines unterschiedlichen Promoters exprimiert werden, da sich wiederholende

25 Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationseignissen führen können. Die Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt vorteilhaft in einem Polylinker anschließend gegebenenfalls ein Terminator hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach bevorzugt drei-, vier- oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und so zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu dreimal. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über die geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker

30 hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihren eigenen Terminator. Derartige vorteilhafte Konstrukte werden beispielsweise in DE 10102337 oder DE 10102338 offenbart (siehe beispielsweise in den angehängten Sequenzprotokollen). Es ist aber auch möglich mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und ggf. vor einem Terminator

35 zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein, ohne dass dadurch die Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der

Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielsweise der USP-, LegB4 oder DC3-Promotor und unterschiedliche Terminatoren verwendet werden. Es ist aber auch möglich nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden. Dies kann jedoch zu unerwünschten Rekombinationsereignissen führen.

- 5 Wie oben beschrieben sollte die Transkription der eingebrachten Gene vorteilhaft durch geeignete Terminatoren am 3'-Ende der eingebrachten Biosynthesegene (hinter dem Stoppcodon) abgebrochen werden. Verwendet werden kann hier z.B. der OCS1 Terminator. Wie auch für die Promotoren, so sollten hier für jedes Gen unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden.
- 10 Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt
- 15 aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxyd-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) oder deren Kombinationen verwendet. Besonders vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen sind Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase, Δ-4-Desaturase-, Δ-5-Desaturase-, Δ-6-Desaturase-, Δ-8-Desaturase-, Δ-9-Desaturase-, Δ-12-Desaturase-, Δ-5-Elongase-, Δ-6-Elongase- und/oder Δ-9-Elongase.
- 20
- 25
- 30

Dabei können die vorgenannten Nukleinsäuren bzw. Gene in Kombination mit anderen Elongasen und Desaturasen in Expressionskassetten, wie den vorgenannten, kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen Mithilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

- 35 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA ver-
- 40

bessert wird. Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen in die Pflanze verwendet werden oder aber in einen Vektoren eingebracht werden.

Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im Verfahren verwendeten erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für ω-3-Desaturasen

- 5 codieren, sowie ggf. weitere im Verfahren verwendete Nukleinsäuren, die für Δ-9-Elongasen, Δ-6-Desaturasen, Δ-8-Desaturasen, Δ-6-Elongasen, Δ-5-Desaturasen, Δ-5-  
10 Elongasen oder Δ-4-Desaturasen codieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, die die verwendeten Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie den Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltrans-  
15 ferasen, Δ-4-Desaturasen, Δ-5-Desaturasen, Δ-6-Desaturasen, Δ-8-Desatasen, Δ-9-Desaturasen, Δ-12-Desaturasen, ω3-Desaturasen, Δ-5-Elongasen, Δ-6-Elongasen und/oder Δ-9-Elongasen. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nuklein-  
20 säuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung). Andere Vektoren werden vorteilhaft beim Einbringen in die  
25 Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren, die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, TMV, Transposons,  
30 IS-Elemente, Phasmide, Phagamide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

Die im Verfahren vorteilhaft verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren umfassen die oben beschriebenen Nukleinsäuresequenzen und/oder das oben beschriebene Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der verwendeten Nukleinsäuren in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll

- Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsg.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin.
- Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann.
- Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Dies ist vorteilhaft, da häufig Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheitshalber in Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise können die  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Gene in bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsg., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F., et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1, 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturaseudocohnilembus, Euplates, Engelmanniella und Styloynchia, insbesondere der Gattung Styloynchia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie bevorzugt in Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)) exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

## 42

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a.

pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40),

- 5 pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., Gene

- 10 Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor.

Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-

- 15 Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten  $\lambda$ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann be-

- 20 kannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHs1, pHs2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1,  $\lambda$ gt11 or pBdCI, in Streptomyces plJ101, plJ364, plJ702 oder plJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667.

- 25 Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe S. cerevisiae umfassen pYe-Desaturasec1 (Baldari et al. (1987) Embo J. 6:229-234), pMfA (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie

- 30 pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsg., S. 396-428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23.

Alternativ können die  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen

- 40 in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten

Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: Cloning Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens können die  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agrobacterium tumefaciens-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthase bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

Die Pflanzengenexpression muss wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Nutzbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von

Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in  
5 Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alphaamylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der Ipt2- oder Ipt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamín-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation

- 5 mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische

- 10 Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus Arabidopsis, beschrieben in WO 99/46394.

15 Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat-

- 20 oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet

- 30 sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhaftweise verwendeten Wirtsorganismen sind Mikroorganismen, wie Pilze oder Hefen oder Pflanzenzellen vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Hanf, Diestel, Erdnuss, Canola, Lein, Soja, Safflor, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplame, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

Ein weiterer erfundungsgemäßer Gegenstand sind wie oben beschrieben isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit ω-3-Desaturase-Aktivität codieren, wobei die durch die Nukleinsäuresequenzen codierten ω-3-Desaturasen C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit zwei, drei, vier oder fünf Doppelbindungen und vorteilhaft mehrfach ungesättigte C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit zwei oder drei Doppelbindungen und mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>-Fettsäuren mit zwei, drei oder vier Doppelbindungen umsetzt. Auch C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit vier oder fünf Doppelbindungen werden desaturiert.

5 Der Begriff "Nukleinsäure(molekül)", wie hier verwendet, umfasst in einer vorteilhaften Ausführungsform zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vor-

10 zugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte ω-3-Desaturasmolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt flankieren.

15 Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 oder eines Teils davon, kann unter

20 Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann Mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Diese können als Hybridsierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) zur Isolierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz

25 der SEQ ID NO: 1 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch 30 das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St.Petersburg, FL)

herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz oder Mithilfe der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von

5 genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Homologe der verwendeten ω-3-Desaturase-Nukleinsäuresequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 bedeuten beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 60 %, vorzugsweise mindestens 70 %, stärker bevorzugt mindestens 80 %, 90 % oder 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder

15 mehr Identität bzw. Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenz oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Weiterhin sind Homologe isolierte Nukleinsäuremoleküle mit einer Nukleotidsequenz, die an die in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenz oder einen Teil davon hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Allelische Varianten umfassen ins-

20 besondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der ω-3-Desaturase besitzen,

25 das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeuten Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 1 kodierten Protein. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw.

30 Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25,

35 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)], die im GCG Software-Packet [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit

40 dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Die falls nicht anders angegeben als Standardeinstellungen immer für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Homologe der SEQ ID NO: 1 bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologe, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

Homologe der SEQ ID NO: 1 bedeuten auch Derivate, wie beispielsweise Promotor-

- 5 varianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktiverne  
10 Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

Die vorgenannten Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit ω-3-Desaturase-Aktivität, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind, werden im erfindungsgemäßen Verfahren zur Modulation der Produktion von PUFAs in transgenen Organismen vorteilhaft in Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee),

- 20 Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwendet und/oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer  
25 Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der PUFAs oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Fettsäuren beeinflussen kann).

- 30

Die Kombination verschiedener Vorläuermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Lipide hat. Da mehrfach ungesättigte Fettsäuren (= PUFAs) nicht nur einfach in Triacylglycerin sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

- 35 Besonders zur Herstellung von PUFAs, beispielsweise Stearidonsäure , Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure eignen sich Boraginaceen, Primulaceen, oder Linaceen. Besonders vorteilhaft eignet sich Lein (*Linum usitatissimum*) zur Herstellung von PUFAS mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen vorteilhaft, wie beschrieben, in Kombination mit weiteren Desaturasen und Elongasen.

- 40 Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modi-

fikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase.

- 5 Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und  
10 zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsg.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993)  
15 Microbiological Reviews 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend wieder für die weitere Elongationen aus den Phospholipiden in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-  
20 Estern auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.

Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C<sub>18</sub>-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C<sub>20</sub> und C<sub>22</sub> verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe der im Verfahren verwendeten ω-3-Desaturase kann Arachidonsäure zu Eicosapentaensäure und Docosapentaensäure zu Docosahexaensäure umgesetzt werden und anschließend für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden. Mit den genannten Enzymen können C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft mindestens 25 drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit vorteilhaft vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül hergestellt werden. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFAs mit 30 höherem Desaturierungsgrad, einschließlich einer weiteren Elongation von C<sub>20</sub> zu C<sub>22</sub>-Fettsäuren. Substrate der verwendeten Desaturase im erfindungsgemäßen Verfahren sind C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren wie zum Beispiel Linolsäure, γ-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Arachidonsäure, Docosatetraensäure oder Docosapentaensäure. Bevorzugte Substrate sind Arachidonsäure, Docosatetraensäure oder Docosapentaensäure. Die synthetisierten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei 35 Doppelbindungen in der Fettsäure fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester beispielsweise in Form ihrer Glyceride an.  
40

Unter dem Begriff "Glycerid" wird ein mit ein, zwei oder drei Carbonsäureresten verestertes Glycerin verstanden (Mono-, Di- oder Triglycerid). Unter "Glycerid" wird auch ein Gemisch an verschiedenen Glyceriden verstanden. Das Glycerid oder das Glyceridgemisch kann weitere Zusätze, z.B. freie Fettsäuren, Antioxidantien, Proteine,

5 Kohlenhydrate, Vitamine und/oder andere Substanzen enthalten.

Unter einem "Glycerid" im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ferner vom Glycerin abgeleitete Derivate verstanden. Dazu zählen neben den oben beschriebenen Fettsäureglyceriden auch Glycerophospholipide und Glyceroglycolipide. Bevorzugt seien hier die Glycerophospholipide wie Lecithin (Phosphatidylcholin), Cardiolipin,

10 Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin und Alkylacylglycerophospholipide beispielhaft genannt.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).

Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Beta-oxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und

20 -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engeneering, Hrsg.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engeneering, Hrsg.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer &

25 Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsg.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1): 1-16.

30 Die im Verfahren hergestellten PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höhere Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden, beispielsweise können Katzen Arachidonsäure nicht mehr synthetisieren.

Unter Phospholipiden, die vorteilhaft von der erfindungsgemäßen ω-3-Desaturase umgesetzt werden, im Sinne der Erfindung sind zu verstehen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin und/oder Phosphatidylinositol vorteilhafterweise Phosphatidylcholin. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fertigproduktes (Verbindungen der Formel I), das in einer bestimmten Zeitspanne und

einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder

- 5 Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer  
10 bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbaupfad sind im Fachgebiet bekannt und umfassen  
15 die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer  
20 bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbaupfade dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

Zusätzlich zu den in SEQ ID NO: 1 gezeigten ω-3-Desaturasen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen

- 25 der ω-3-Desaturase führen, innerhalb einer Population existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im ω-3-Desaturase-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des ω-3-Desaturase-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus  
30 resultierende Aminosäurepolymorphismen in der ω-3-Desaturase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Nukleinsäuremoleküle können auf der Grundlage ihrer Homologie zu den hier offenbarten ω-3-Desaturase-Nuklein-

- 35 säuren unter Verwendung der Sequenzen oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Dabei können beispielsweise isolierte Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die mindestens 15 Nukleotide lang sind und unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekülen, die eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 umfassen, hybridisieren. Es können auch Nukleinsäuren mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide verwendet werden. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 %

## 52

homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben.

- 5 Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodiumcitrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren
- 10 Waschschriften in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der
- 15 Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im obengenannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen
- 20 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die
- 25 erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

- 30
- Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. der Sequenz SEQ ID NO: 2) oder von zwei Nukleinsäuren (z.B. SEQ ID NO: 1) werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der

Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen. Die verwendeten Programme bzw. Algorithmen sind oben beschrieben.

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine ω-3-Desaturase kodiert, die zur Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer

- 5 Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenz der SEQ ID NO: 1 durch Standardtechniken, wie stellen-spezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vor-zugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konser-vativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Amino-säureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen
- 10 Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seiten-ketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seiten-ketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Trypto-phan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aroma-tischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorher-gesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer Lysophosphatidsäure Acyltrans-ferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können
- 15 bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der Lysophosphatidsäure Acyltransferase, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase, Diacylglycerin Acyltransferase oder Lecithin Cholesterin Acyltrans-ferase kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen Lysophosphatid-säure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyl-transferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die die Lysophosphatidsäure Acyltransferase-, Glycerin-3-phosphat Acyltransferase-, Diacylglycerin Acyltransferase- oder Lecithin Cholesterin Acyltransferase-Aktivität beibehalten haben. Nach der Mutagenese einer der Sequen-zen der SEQ ID NO: 1 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests bestimmt werden.

Weitere Erfindungsgegenstände sind transgene nicht-humanen Organismen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren SEQ ID NO: 1 enthalten oder ein Genkonstrukt

- 40 oder einen Vektor, die diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Vorteilhaft handelt es sich bei dem nicht-humanen Organismus um einen Mikro-organismus, ein nicht-humanes Tier oder eine Pflanze, besonders bevorzugt um eine Pflanze.

## 54

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

## 5 Beispiele

## Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren:

Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

## Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 3: Klonierung der  $\omega$ -3-spezifischen Desaturase aus Phytophthora infestans

20 Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen entsprechend der in der Beschreibung aufgeführten Desaturase-Gene, wurde eine Sequenz mit entsprechenden für eine Desaturase charakteristischen Motiven in einer EST-Sequenzdatenbank identifiziert.

Gen-Name	Genbank No	Aminosäuren
Pi-omega3Des	SEQ ID NO: 1	361

25 Gesamt-RNA von Phytophthora infestans wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Valencia, CA, US) isoliert und zur Herstellung einer EST-Sequenzdatenbank verwendet. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von oligo-dT-Cellulose poly-A+ RNA (mRNA) isoliert (Sambrook et al., 1989). Die RNA wurde mit dem Reverse Transcription System Kit von Promega revers transkribiert und die synthetisierte cDNA in den lambda ZAP Vektor (lambda ZAP Gold, Stratagene) kloniert. Entsprechend Herstellerangaben wurde die cDNA zur Plasmid-DNA entpackt. Die cDNA-Plasmid-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden verwendet. Die Sequenzdaten wurden in einer entsprechenden Datenbank abgeleget.

Beispiel 4: Klonierung eines Expressionsplasmides zur heterologen Expression der Pi-omega3Des in Hefen

Der Pi-omega3Des Klon wurde für die heterologe Expression in Hefen über PCR mit entsprechenden Pi-omega3Des spezifischen Primern in den Hefe-Expressions-

- 5 vektor pYES3 kloniert. Dabei wurde ausschließlich der für das Pi-omega3Des Protein kodierende offene Leseraster des Gens amplifiziert und mit zwei Schnittstellen für die Klonierung in den pYES3 Expressionsvektor versehen:

Forward Primer: 5'-TAAGCTTACATGGCGACGAAGGAGG

10 Reverse Primer: 5'-TGGATCCACTTACGTGGACTTGGT

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

15 5,00 µL Template cDNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µL 2mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/µL des 5'-ATG sowie des 3'-Stopp Primers)

0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

20 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

25 Das PCR Produkt wurde für 2 h bei 37 °C mit den Restriktionsenzymen HindIII und

BamHI inkubiert. Der Hefe-Expressionsvektor pYES3 (Invitrogen) wurde in gleicherweise inkubiert. Anschließend wurde das 1104 bp große PCR Produkt sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und Desaturase-

30 cDNA ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pYES3-Pi-omega3Des wurde durch Sequenzierung überprüft und in den *Saccharomyces* Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde pYES3 parallel transformiert. Anschliessend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Tryptophan mit 2 % Glucose ausplattiert.

35 Zellen, die auf ohne Tryptophan im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES3, pYES3-Pi-omega3Des. Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Beispiel 5: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurde mit folgendem Primerpaar NotI-

- 5 Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:  
PSUN-Pi-omega3Des

Reverse: 3'-GC GGCCGCTTACGTGGACTTGGTC

Forward: 5'-GC GGCCGCGatGGCGACGAAGGAGG

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 10 5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
0,50 µL Advantage-Polymerase  
15 Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

20 Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte wurden für 4 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert.

Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert.

- 25 Anschließend wurde die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pSUN-Piomega3Des wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Beispiel 6: Expression von Pi-omega3Des in Hefen

- 30 Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit dem Plasmid pYES3 oder pYES3- Pi-omega3Des transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:  
Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethyl-

ester (FAMEs) durch saure Methanolysen hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die

- 5 organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für  
10 die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert. Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, Lipids. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, Journal of Experimental Botany. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, Arch. Biochem. Biophys. 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, FEBS Letters. 439(3):215-218.

15 Beispiel 7: Funktionelle Charakterisierung von Pi-omega3Des:

Die Substratspezifität der konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Figur 2 bis 8). Die gefütterten Substrate liegen in großen Mengen in allen transgenen Hefen vor, wodurch die Aufnahme dieser Fettsäuren in die

- 20 Hefen bewiesen ist. Die transgenen Hefen zeigen die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der Pi-omega3Des-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen Pi-omega3Des funktional exprimiert werden konnte.

Figur 2 gibt die Desaturierung von Linolsäure (18:2 ω-6-Fettsäure) zu α-Linolensäure (18:3 ω-3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 2 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 2 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C18:2<sup>Δ9,12</sup>-Fettsäure (300 µM) kultiviert. Anschließend wurden die FAMEs über GLC analysiert.

30 In Figur 3 ist die Desaturierung von γ-Linolensäure (18:3 ω-6-Fettsäure) zu Stearidonsäure (18:4 ω-3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des wiedergegeben.

Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 3 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 3 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von γ-C18:3<sup>Δ6,9,12</sup>-Fettsäure (300 µM) kultiviert. Anschließend wurden die FAMEs über GLC analysiert.

## 58

Figur 4 gibt die Desaturierung von C20:2- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:3- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 4 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 4 B) transformiert worden waren. Die Hefen 5 wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C20:2<sup>A11,14</sup>-Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMEs über GLC analysiert.

Figur 5 gibt die Desaturierung von C20:3- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:4- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure 10 Methanolysen intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 5 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 5 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C20:3<sup>A8,11,14</sup>-Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMEs über GLC analysiert.

15 In Figur 6 wird die Desaturierung von Arachidonsäure (C20:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Eicosapentaensäure (C20:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des gezeigt. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 6 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 6 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimal- 20 medium in Gegenwart von C20:4<sup>A5,8,11,14</sup>-Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMEs über GLC analysiert.

25 Figur 7 gibt die Desaturierung von Docosatetraensäure (C22:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Docosapentaensäure (C22:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 7 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 7 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in 30 Gegenwart von C22:4<sup>A7,10,13,16</sup>-Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMEs über GLC analysiert.

35 Die Substratspezifität der Pi-omega3Des gegenüber verschiedenen Fettsäuren ist Figur 8 zu entnehmen. Die Hefen, die mit dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolysen intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMEs über GLC analysiert. Jeder Wert gibt einen Mittelwert aus drei Messungen wieder. Die Umsetzungsrationen (% Desaturation) wurden mit der Formel:  
[Produkt]/[Produkt]+[Substrat]\*100 errechnet.

## Beispiel 8: Lipidextraktion aus Samen:

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünn-

5 schichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Bio-

10 chemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3;

15 20 Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative

25 und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

30 Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyse-

35 verfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied

40 Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

## 60

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnsschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels

- 5 Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).
- 10 Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glas- mühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren auf- gebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 15 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbin- dungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 20 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Ver- wendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

- 25 Dann wird 10 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedi- mentiert. Das Zellsediment wird mit 1 M methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resul- tierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extra- hierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem 30 Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fettsäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME- Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung kann durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimeth- 35 oxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS weiter analysiert werden.

**Beispiel 9: Erzeugung von transgenen Pflanzen**

- a) Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen wurden binäre Vektoren in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 oder Escherichia coli genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nordeutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtkultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 5 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige 10 Colinkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit weitergeführt 15 und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 mikroM Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln 20 zum Medium gegeben.

Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf ω-3-Desaturase-Expression mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an C20- und C22 mehrfachungesättigten Fettsäuren wurden so 25 identifiziert.

b) Herstellung von transgenen Leinpflanzen

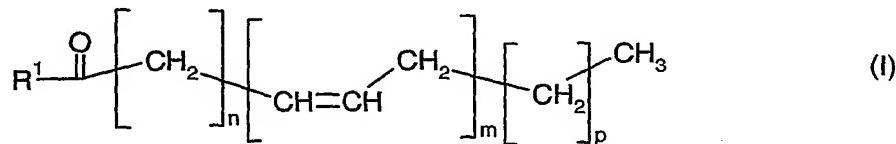
Die Herstellung von transgenen Leinpflanzen können zum Beispiel nach der Methode von Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 35(6):456-465 mittels particle bombardment erzeugt werden. Agrobakterien-vermittelte Transformationen können 30 zum Beispiel nach Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282-285 hergestellt werden.

Äquivalente

Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst 35 sein.

## Patentansprüche

## 1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I

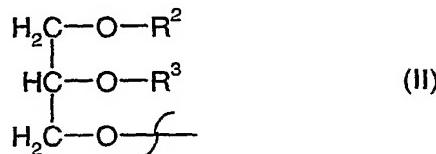


5 in transgenen Organismen mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.-% dieser Verbindungen bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität codiert, und
  - b) Anzucht des Organismus unter Bedingungen, die die Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel I ermöglicht, und

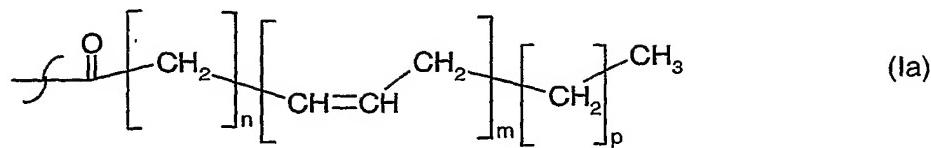
wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

**R<sup>1</sup>** = Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



20 R<sup>2</sup> = Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-,  
Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-  
Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder  
ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-,

25             $R^3$  = Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-,  
              oder R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen  
              Formel Ia:



$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $9, m = 2, 3, 4, 5$  oder  $6$  und  $p = 0$  oder  $3$ .

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zur unter Punkt a) eingebrachten Nukleinsäuresequenz, die für eine  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität codiert, weitere Nukleinsäuresequenzen eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten  $R^2$  oder  $R^3$  unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes  $C_{18}$ - $C_{22}$ -Alkylcarbonyl- bedeuten.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten  $R^2$  oder  $R^3$  unabhängig voneinander ungesättigtes  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - oder  $C_{22}$ -Alkylcarbonyl- mit mindestens zwei Doppelbindungen bedeuten.
15. 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus ein transgener Mikroorganismus oder eine transgene Pflanze ist.
20. 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus eine Ölproduzierende Pflanze, eine Gemüsepflanze oder Zierpflanze ist.
25. 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die transgene Organismus eine transgene Pflanze ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien Adelotheciaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Crypthecodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae oder Prasinophyceae ist.
30. 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel I aus dem Organismus in Form ihrer Öle, Lipide oder freien Fettsäuren isoliert werden.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel I in einer Konzentration von mindestens

5 Gew.-% bezogenen auf den gesamten Lipidgehalt des transgenen Organismus isoliert werden.

10. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
- 5 11. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die PUFA's hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 umfasst und von transgenen Pflanzen stammt.
- 10 12. Verfahren zur Herstellung von Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen durch Mischen von Öl, Lipide oder Fettsäuren gemäß Anspruch 10 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 11 mit tierischen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren.
- 15 13. Verwendung von Öl, Lipide oder Fettsäuren gemäß Anspruch 10, Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 11 oder Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen hergestellt gemäß Anspruch 12 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.
14. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- 20 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2 codieren und eine  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 25 15. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 14, wobei die Sequenz von einer Alge, einem Pilz, einem Mikroorganismus oder einem nicht-humanen Tier stammt.
16. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 14 oder 15, wobei die Sequenz aus der Familie der Pythiaceae stammt.
- 30 17. Aminosäuresequenz, die von einer isolierten Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 14 bis 16 codiert wird.
18. Genkonstrukt, enthaltend eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.

19. Genkonstrukt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n).
- 5 10 20. Genkonstrukt nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -9-Elongase.
- 15 21. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 14 bis 16 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 18.
22. Transgener nicht-humaner Organismus, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 14 bis 16, ein Genkonstrukt nach Anspruch 18 oder einen Vektor nach Anspruch 21.
- 20 23. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 22, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein nicht-humane Tier oder eine Pflanze ist.
24. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 22 oder 23, wobei der Organismus eine Pflanze ist.

Verfahren zur Herstellung ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren in transgenen Organismen

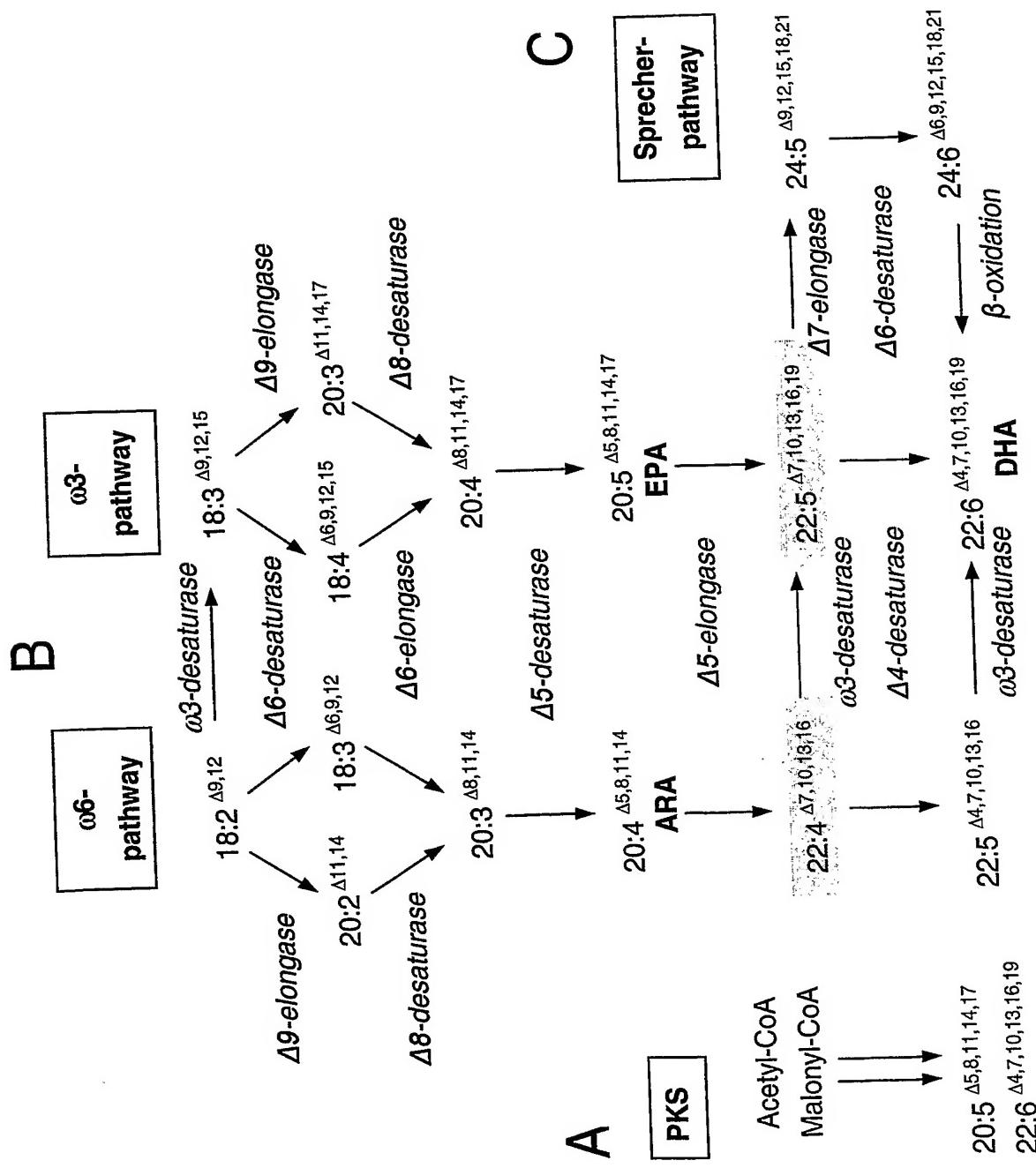
Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten  $\omega$ -3 Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, besonders von  $\omega$ -3 Fettsäuren mit mehr als drei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\omega$ -3-Doppelbindungen aufgrund der Expression einer  $\omega$ -3-Desaturase aus Pilzen der Familie Pythiaceae wie der Gattung Phytophthora beispielsweise der Gattung und Art Phytophthora infestans.

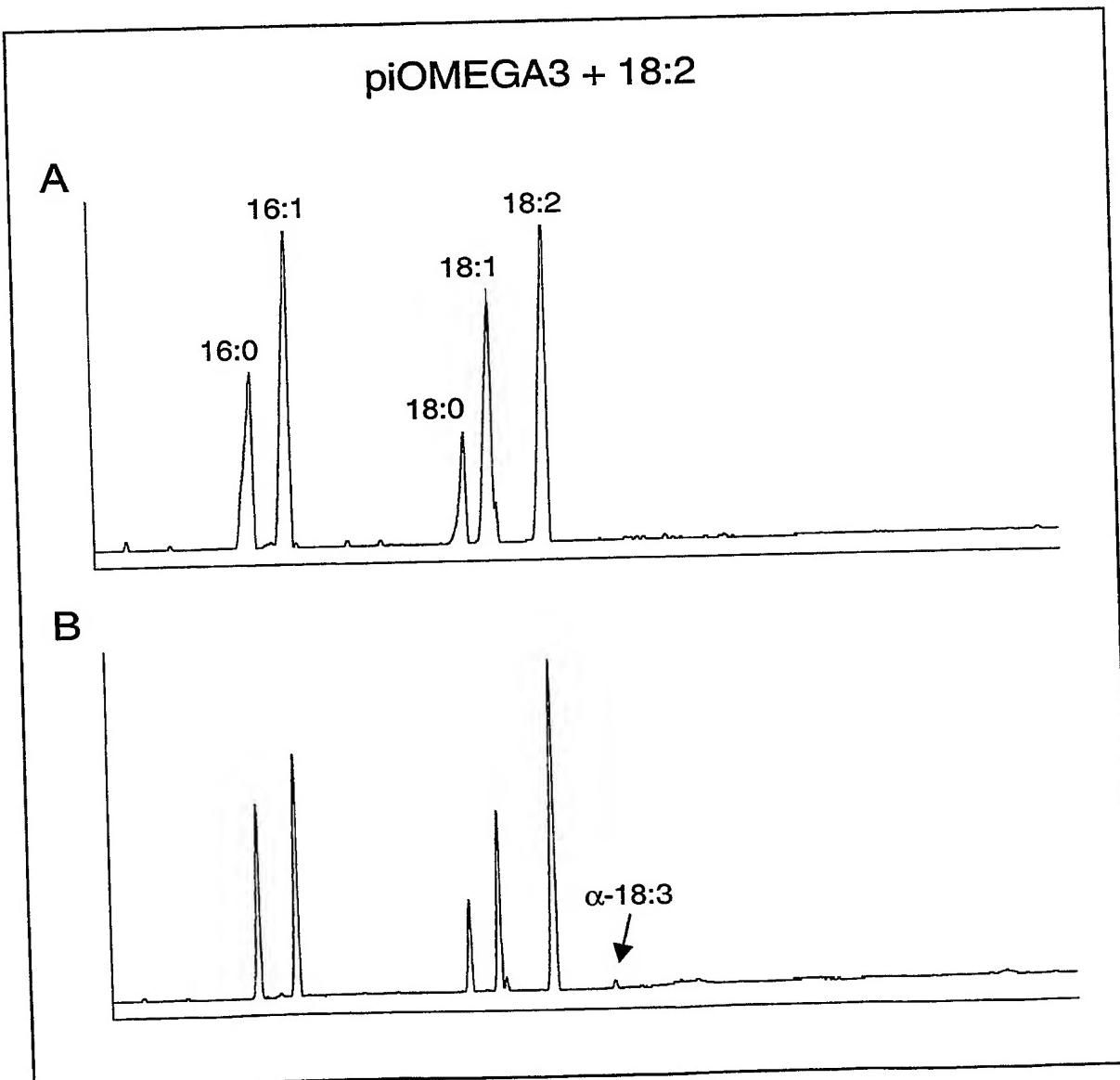
Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, mindestens einen Vektor enthaltend die Nukleinsäuresequenz und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren.

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

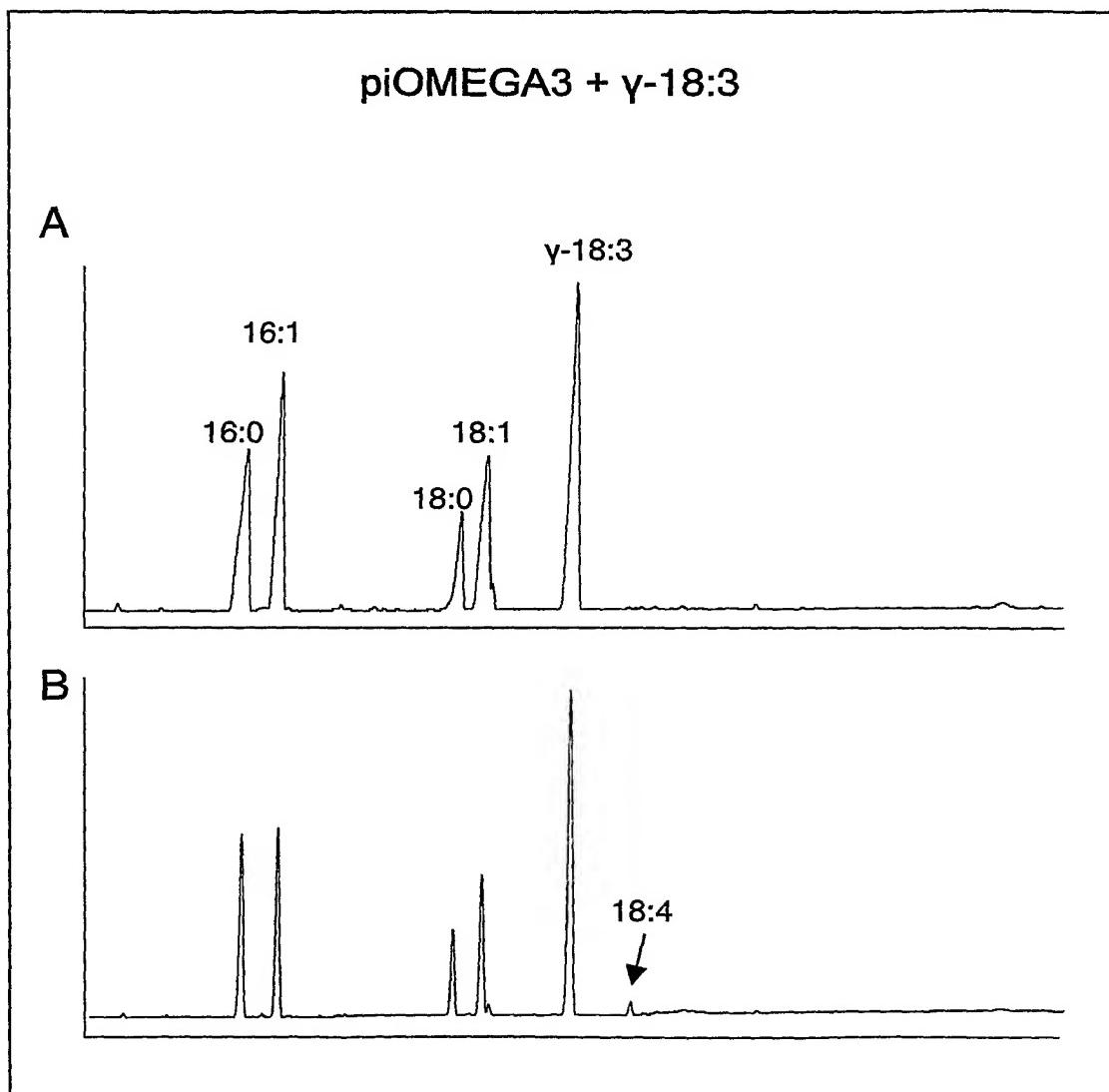
Figur 1: Verschiedene Synthese-Wege zur Biosynthese von DHA (Docosahexaensäure)



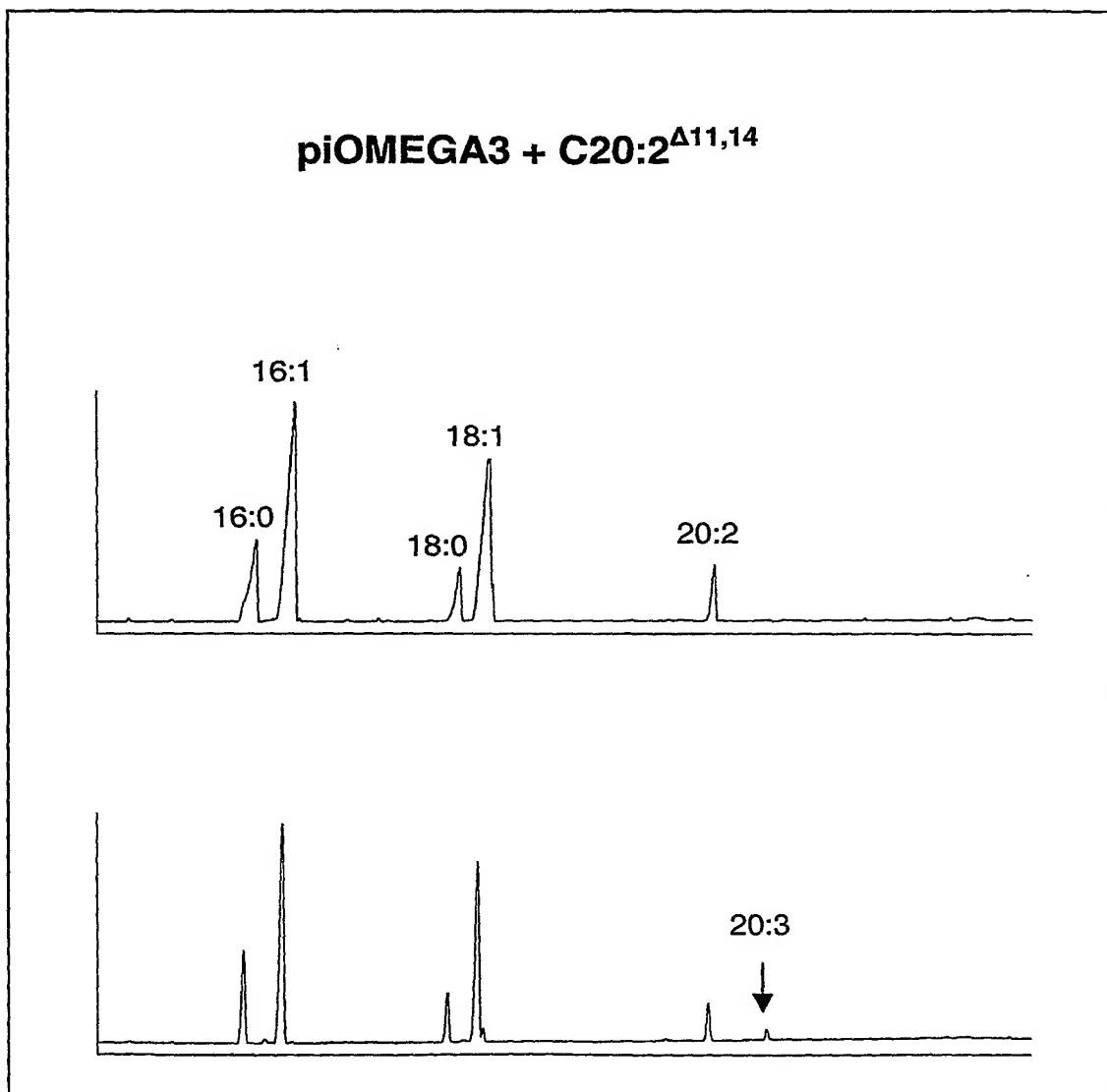
Figur 2: Desaturierung von Linolsäure (18:2  $\omega$ -6-Fettsäure) zu  $\alpha$ -Linolensäure (18:3  $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.



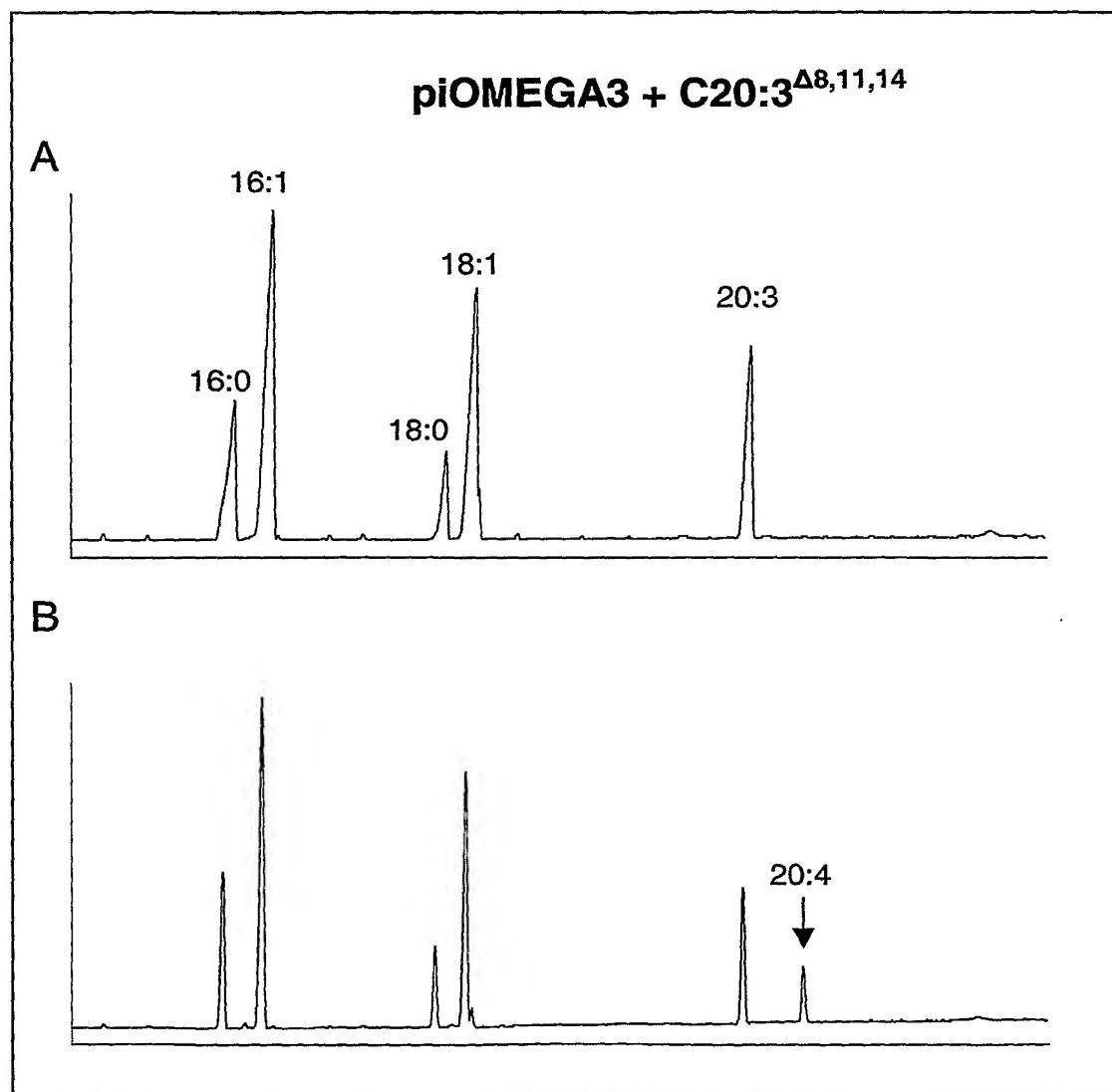
Figur 3: Desaturierung von  $\gamma$ -Linolensäure (18:3  $\omega$ -6-Fettsäure) zu Stearidonsäure (18:4  $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.



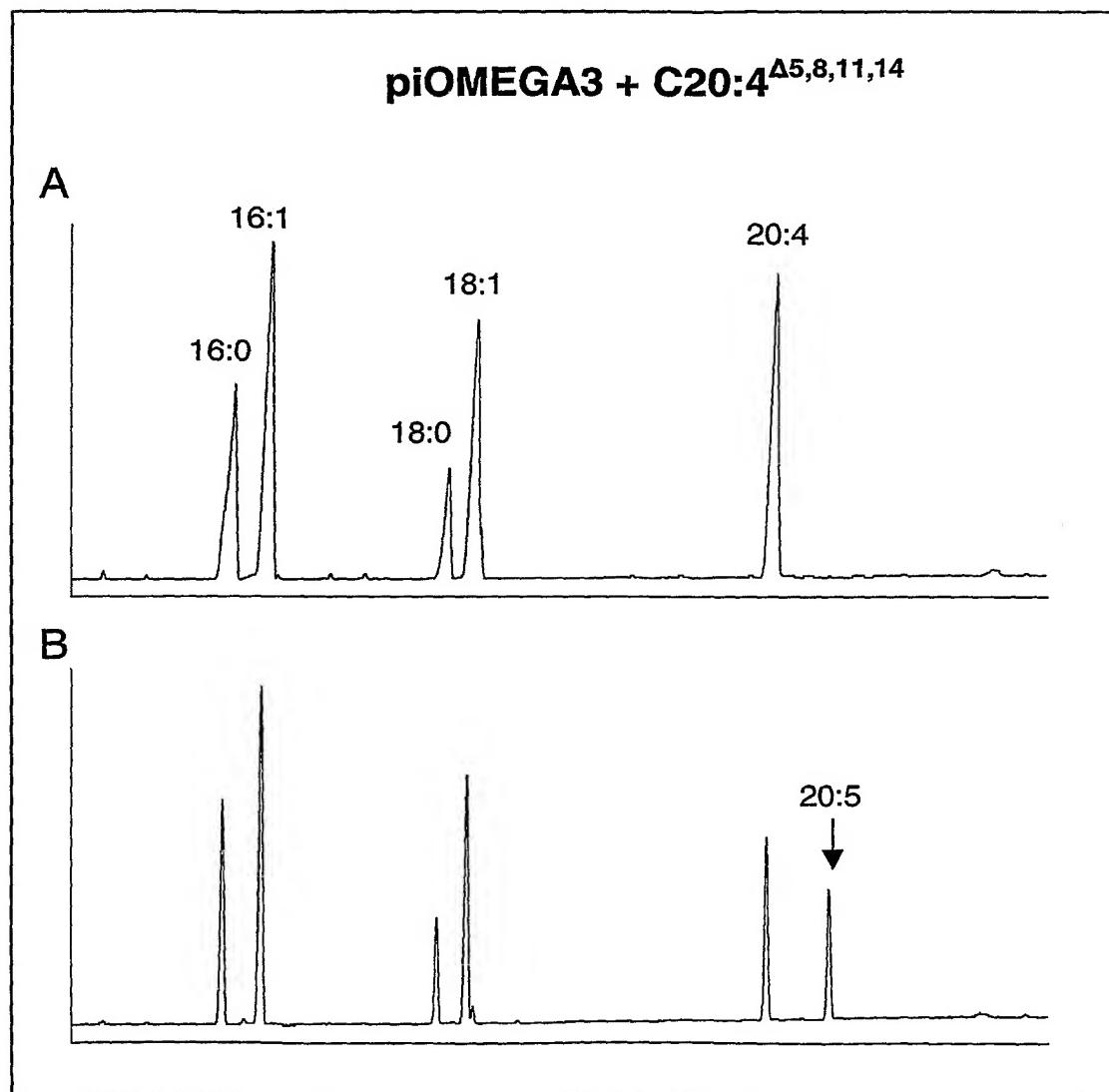
Figur 4: Desaturierung von C20:2  $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:3  $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des.



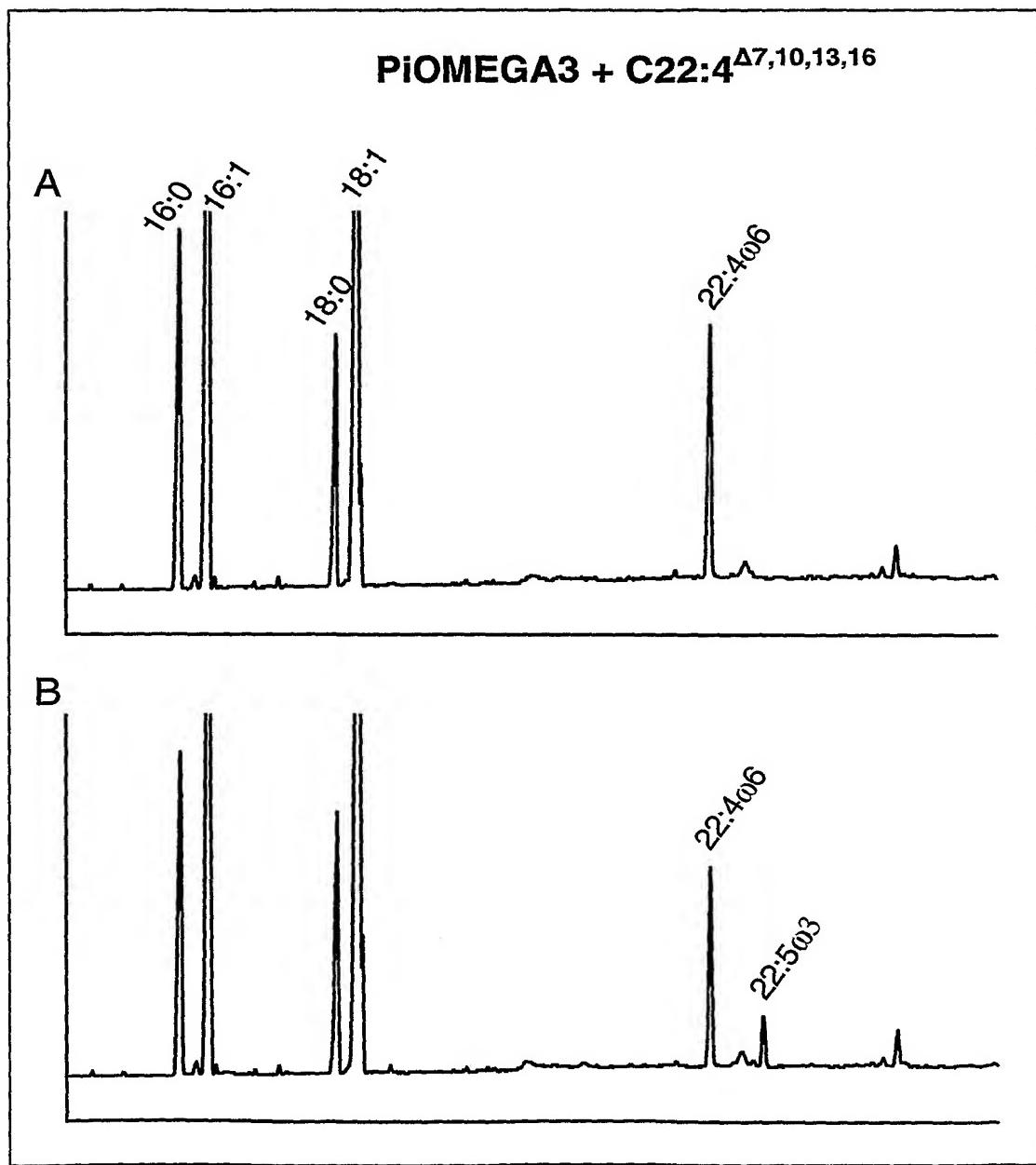
Figur 5: Desaturierung von C20:3- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:4- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des.

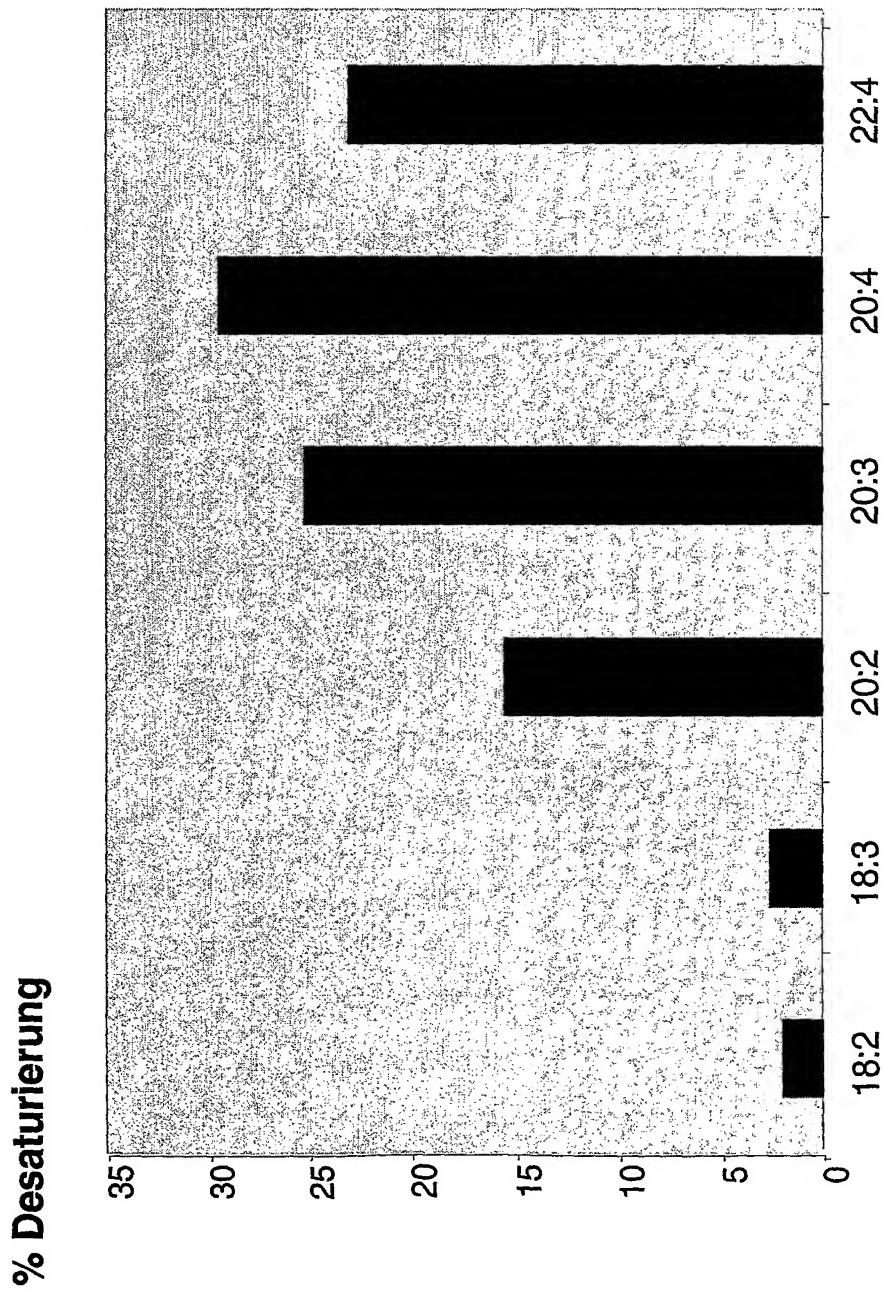


Figur 6: Desaturierung von Arachidonsäure (C20:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Eicosapentaensäure (C20:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des.



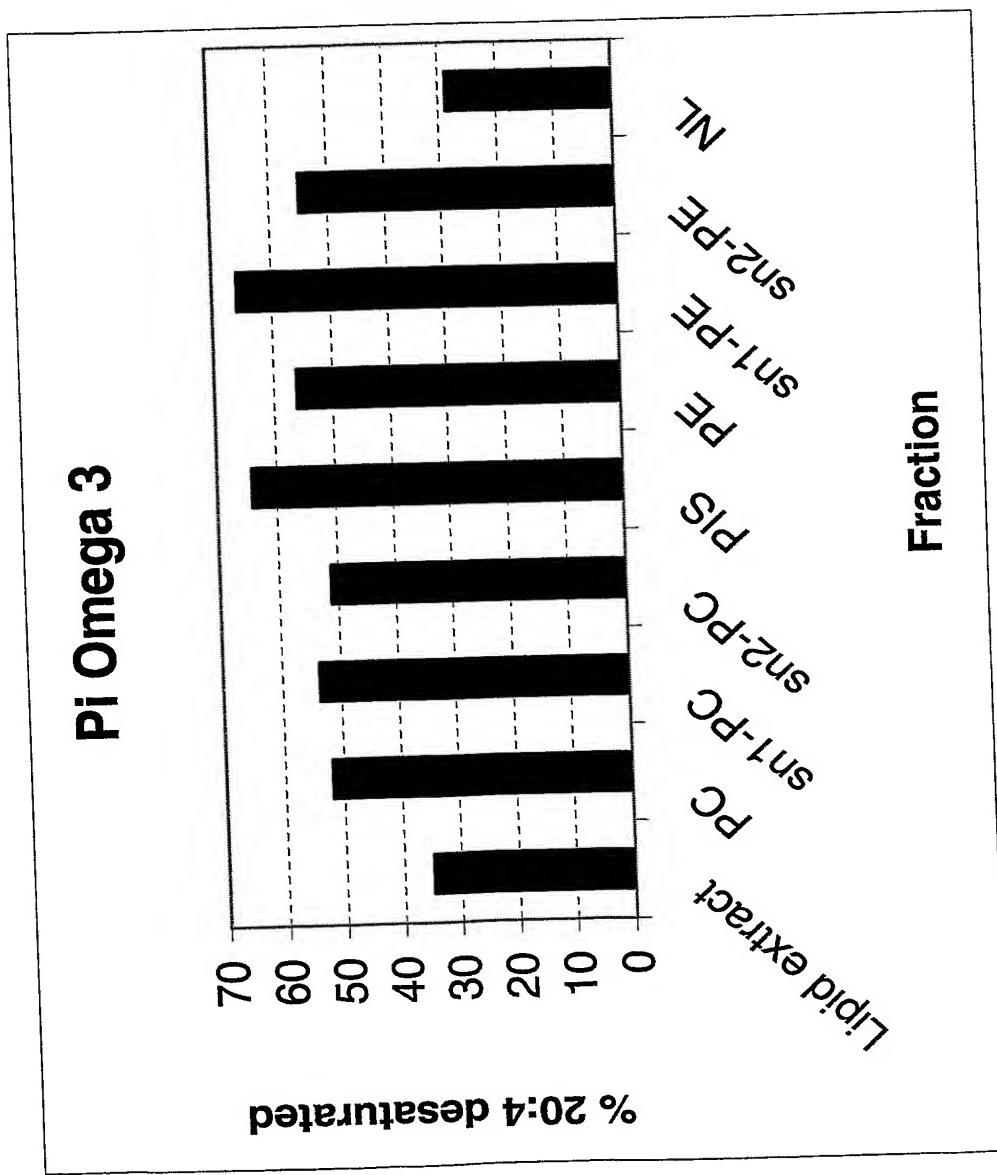
Figur 7: Desaturierung von Docosatetraensäure (C22:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Docosa-pentaensäure (C22:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.





Figur 8: Substratspezifität der Pi-omega3Des gegenüber verschiedenen Fettsäuren

Figur 9: Desaturierung von Phospholipid gebundener Arachidonsäure zu EPA durch die Pi-Omega3Des



## SEQUENCE LISTING

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Verfahren zur Herstellung ungesättigten omega-3-Fettsäuren in transgenen Organismen

<130> PF 55371

<140> 20040003

<141> 2004-02-26

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1086

<212> DNA

<213> Phytophthora infestans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1086)

<223> Omega-3-Desaturase

<400> 1  
atg gcg acg aag gag ggc tat gtg ttc ccc act ctg acg gag atc aag 48  
Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys  
5 10 15  
1 5 10 15

cgg tcg cta cct aaa gac tgt ttc gag gct tcg gtg cct ctg tcg ctc 96  
Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu  
20 25 30

tac tac acc gtg cgt tgt ctg gtg atc gcg gtg gct cta acc ttc ggt 144  
Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly  
35 40 45

ctc aac tac gct cgc gct ctg ccc gag gtc gag agc ttc tgg gct ctg 192  
Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu  
50 55 60

gac gcc gca ctc tgc acg ggc tac atc ttg ctg cag ggc atc gtg ttc 240  
Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe  
65 70 75 80

tgg ggc ttc ttc acg gtg ggc cac gat gcc ggc cac ggc gcc ttc tcg 288  
Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser  
85 90 95

## 2

cgc tac cac ctg ctt aac ttc gtg gtg ggc act ttc atg cac tac ctc		336
Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu		
100	105	110
atc ctc acg ccc ttc gag tcg tgg aag ctc acg cac cgt cac cac cac		384
Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His		
115	120	125
aag aac acg ggc aac att gac cgt gac gag gtc ttc tac ccg caa cgc		432
Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg		
130	135	140
aag gcc gac gac cac ccg ctg tct cgc aac ctg att ctg gcg ctc ggg		480
Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly		
145	150	155
160		
gca gcg tgg ctc gcc tat ttg gtc gag ggc ttc cct cct cgt aag gtc		528
Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val		
165	170	175
aac cac ttc aac ccg ttc gag cct ctg ttc gtg cgt cag gtg tca gct		576
Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gin Val Ser Ala		
180	185	190
gtg gta atc tct ctt ctc gcc cac ttc ttc gtg gcc gga ctc tcc atc		624
Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile		
195	200	205
tat ctg agc ctc cag ctg ggc ctt aag acg atg gca atc tac tac tat		672
Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr		
210	215	220
gga cct gtt ttt gtg ttc ggc agc atg ctg gtc att acc acc ttc cta		720
Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu		
225	230	235
240		
cac cac aat gat gag gag acc cca tgg tac gcc gac tcg gag tgg acg		768
His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr		
245	250	255
tac gtc aag ggc aac ctc tcg tcc gtg gac cga tcg tac ggc gcg ctc		816
Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu		
260	265	270
att gac aac ctg agc cac aac atc ggc acg cac cag atc cac cac ctt		864
Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu		
275	280	285
ttc cct atc att ccg cac tac aaa ctc aag aaa gcc act gcg gcc ttc		912
Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe		
290	295	300
cac cag gct ttc cct gag ctc gtg cgc aag acg gac gag cca att atc		960
His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile		
305	310	315
320		

## 3

aag gct ttc ttc cgg gtt gga cgt ctc tac gca aac tac ggc gtt gtg Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val 325	330	335	1008
gac cag gag gcg aag ctc ttc acg cta aag gaa gcc aag gcg gcg acc Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr 340	345	350	1056
gag gcg gcg gcc aag acc aag tcc acg taa Glu Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr 355	360		1086
<210> 2			
<211> 361			
<212> PRT			
<213> Phytophthora infestans			
<400> 2			
Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys 1 5 10 15			
Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu 20 25 30			
Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly 35 40 45			
Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu 50 55 60			
Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gin Gly Ile Val Phe 65 70 75 80			
Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser 85 90 95			
Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu 100 105 110			
Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His 115 120 125			
Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg 130 135 140			
Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly 145 150 155 160			
Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val 165 170 175			

Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala  
180 185 190

Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile  
195 200 205

Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr  
210 215 220

Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu  
225 230 235 240

His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr  
245 250 255

Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu  
260 265 270

Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu  
275 280 285

Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe  
290 295 300

His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile  
305 310 315 320

Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val  
325 330 335

Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr  
340 345 350

Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr  
355 360